

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Hiddemann

**EXPRESSION UND RELEVANZ VON BETA-INTEGRINEN,
AKTIVIERUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSANTIGENEN
AUF T-ZELLEN VOR UND NACH STIMULATION MIT
DENDRITISCHEN ZELLEN LEUKÄMISCHEN URSPRUNGS**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Valentin Vogt

aus

Freiburg

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Helga Schmetzer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Albert
Priv. Doz. Dr. Christian Ries

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	9
2. Einleitung	11
2.1 Definition, Ätiologie und Einteilung der Akuten Myeloischen Leukämie.....	11
2.2 Diagnostik, Klassifikation und Prognose der Akuten Myeloischen Leukämie	14
2.3 Therapie.....	18
2.4 Antigenpräsentation über Dendritische Zellen und T-Zellaktivierung.....	25
2.5 Integrine.....	33
3. Material & Methoden	35
3.1 Patientenkollektiv	35
3.2 Verarbeitung des Zellmaterials.....	37
3.3 Generierung von DC leukämischer Abstammung (‘DC’)	38
3.4 Quantifizierung und Charakterisierung von ‘DC’	39
3.5 Ergebnis der ‘DC’-Generierung	42
3.6 Gemischte Lymphozytenkultur (MLR)	43
3.7 Durchflusszytometrie	43
3.8 T-Zell Charakterisierung	44
3.9 Blastenlysetest	46
3.10 Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	46
4. Ergebnisse	47
4.1 Vor Stimulation	47
4.2 Nach Stimulation.....	49
4.3 Kinetik.....	52
4.4 Lyseverhalten	56
4.5 ‘Cut-off Werte’	61
5. Diskussion	67
5.1 Die Rolle von T-Zellen in der Tumorabwehr.....	67
5.2 Die beste Strategie zur T-Zell Charakterisierung	67
5.3 Vergleich von T-Zell Subtypen in AML-Patienten und gesunden Probanden.....	68
5.4 Die Stimulation von T-Zellen von AML Patienten mit ‘MNC’ oder ‘DC’ erhöht die Anteile von aktivierten T-Zellen mit Effektorfunktion.....	69
5.5 Geringere Anteile an β -Integrin-exprimierenden T-Zellen nach Stimulation als spezifischer Marker für eine antileukämische T-Zell Aktivierung?.....	70
5.6 Entwicklung der T-Zell Subtypen während der Stimulation.....	71
5.7 Die antileukämische Funktionalität korreliert mit den T-Zell-Subtypen.	72

5.8 Der Grad der Aktivierung bei T-Zellen korreliert mit der Funktionalität im Lyse Test	75
5.9 Hohe Anteile von β -Integrinen korrelieren mit antileukämischer Funktionalität	75
6. Zusammenfassung und Ausblick.....	77
7. Literatur.....	79
8. Eidesstattliche Versicherung	86
9. Eigene Publikationen und Kongressbeiträge.....	87
10. Danksagung	89

Abkürzungen

Aberr.	aberrant
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Antigen präsentierende Zellen
AraC	Cytosin-Arabinosid
Bla	Blasten
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Calcium
CD	Differentiation Antigen /cluster of differentiation
CML	chronisch myeloische Leukämie
CMML	chronisch myelomonozytäre Leukämie
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CSF	colony stimulating factor
CTL	zytotoxische T-Zelle
CyA	Ciclosporin A
d	Tage
DC	Dendritische Zellen
‘DC’	DC Zellen leukämischen Ursprungs/ leukemia-derived DC
DGHO	Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
Dgn	Diagnose
del	Deletion
DLI	Spenderlymphozyten/ Donor Lymphozyten Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAB-Klassifikation	French-American-British-Klassifikation
FACS	Fluorescent-activated cell sorting/ Durchflusszytometer
FCS	fetal calf serum/ fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

FLT3	fms-like Tyrosinkinase 3
FSC	Forward Scatter
GIT	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulozyten/ Makrophagen stimulierender Faktor
GvL	Graft versus Leukemia
GvH	Graft versus Host
GvHD	Graft versus Host Erkrankung
Gy	Gray
HAM	hoch-dosiert Cytarabine und Mitoxanthrone
HLA	humanes Lymphozyten Antigen
i	intermediär
ICAM	intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
ins	Insertion
inv	Inversion
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarkstransplantation
L	Ligand
LAA	Leukämie-assoziiertes Antigen
m	männlich
MCM	monocyte-derived medium
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Mg	Magnesium
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MLR	gemischte Lymphozytenkultur
MNC	Mononukleäre Zellen
moABs	monoklonale Maus-Antikörper
MPO	Myeloxygenase
MRD	minimale Resterkrankung

n	Anzahl Proben
nd	nicht durchgeführt
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSE	unspezifische Esterase
pAML	primäre AML
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PAS	periodic acid Schiff-Reaktion
PB	peripheres Blut
PBS	phosphate buffered saline
PC7	Phycoerythrin-Cyanine 7
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pers.	Persistenz
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
POX	myeloperoxidase
PR	partielle Remission
q	langer Arm eines Chromosoms
RHAMM	Receptor for hyaluronic acid-mediated motility
RNA/RNS	Ribodesoxynucleinsäure
Rez	Rezidiv
sAML	sekundäre AML
SBB	Sudan black B stain
SSC	Side Scatter
SZT	Stammzelltransplantation
t	Translokation
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TAD	Thioguanine, Cytarabine, und Daunorubicin
TLR	Toll-like receptor
t-AML	Therapie-bedingte AML
T _{cm}	Zentrale Gedächtniszellen T-Zellen/ central memory T-cells

T _{scm}	T-Gedächtnisstammzellen / memory T stem cells
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{em}	Effektor Gedächtniszellen T-Zellen/ effector memory T-cells
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TFNR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
U	Unit/Einheiten
VR	Vollremission
w	weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation/ World Health Organisation
WT1	Wilms Tumor 1

1. Zusammenfassung

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine neoplastische Erkrankung der Hämatopoese, welche durch eine übersteigerte Zellproliferation und gestörte Differenzierung der myeloischen Zellreihe charakterisiert ist. Obwohl initiale Chemotherapien hohe Raten an Remissionen erreichen liegt die 4-Jahres-Überlebensrate der Patienten lediglich bei 34%. Stammzelltransplantationen (SZT) und die Gabe von Spenderlymphozyten (DLI) sind vielversprechende kurative Ansätze in der Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie (Jabbour, Estey, and Kantarjian, 2006; Kolb, 2008; Schmid et al., 2012a). T-Zellen sind die Hauptmediatoren der antileukämischen Immunantwort und somit wichtige Effektoren der Immuntherapie (Schmetzer, 2011). Wir und andere Gruppen konnten bereits zeigen, dass Dendritische Zellen leukämischen Ursprungs (DC_{leu}, in der Folge als ‘DC’ abgekürzt) nach Stimulation die antileukämische Funktionalität von T-Zellen verbessern, auch wenn dies nicht in jedem einzelnen Fall gelingt (Grabrucker et al., 2010; Liepert et al., 2010). ‘DC’ wurden mit 4 verschiedenen serumfreien Kulturmedien [‘MCM-Mimic’, ‘Ca-Ionophore (A 23187)’, ‘Picibanil (OK-432)’ und ‘Intron’] in einem Vorversuch aus blastenhaltigen PB-MNCs generiert und die ergiebigste Methode im ‘Hauptversuch’ zur quantitativen ‘DC’ Generierung verwendet (Kremser et al., 2010).

Die Quantität und Qualität der ‘DC’ und T-Zellen wurde mit Hilfe einer von unserer Arbeitsgruppe etablierten Gatingstrategie in Kombination mit einer durchflusszytometrischen Analyse der erhaltenen Zellen bestimmt (Grabrucker et al., 2010; Liepert et al., 2010). Um die bestmögliche Charakterisierung der T-Zell-Subtypen vornehmen zu können verglichen wir verschiedene T-Zell-Panels in einem Vorversuch. Dabei kamen wir zu dem Schluss, dass sich die von Sallusto beschriebenen T-Zellsubtypen T_{naive}, T_{cm}, T_{em} und T_{eff} (Sallusto et al., 1999) am besten mit den Oberflächenmarkern CD45RO, CCR7 und CD27 darstellen ließen. Auf diese Weise war es sogar möglich in einem 4-Kanal-Durchflusszytometer einen weiteren Oberflächenmarker dazu zu kombinieren. Mittels Durchflusszytometrie bestimmten wir die Zusammensetzung und Differenzierung von verschiedenen T-Zell-Subtypen in 12 AML Patienten im Vergleich zu 5 gesunden Probanden vor, während und nach Stimulation mit ‘DC’ oder mononukleären Zellen (‘MNC’) in einer 7 Tage währenden gemischten Lymphozyten-Reaktion (MLR). Dabei legten wir den Fokus auf die qualitative und quantitative Erfassung aktivierter T-Zellen, von T-Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien (T_{naive}, T_{cm}, T_{em} und T_{eff}) und von β -Integrin-exprimierenden T-Zellen. Zusätzlich verglichen wir stimulierte und nicht-stimulierte T-Zellen in ihrer Zusammensetzung und bestimmten deren antileukämische Funktionalität. Ziel dieser Arbeit

war es Zusammenhänge der T-Zell-Profile mit der Funktionalität zu erkennen und prädiktive Marker herauszuarbeiten.

Wir konnten zeigen, dass die T-Zellen von AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden vor Stimulation signifikant geringere Anteile an aktivierten T-Zellen, T_{cm} und β -Integrin⁺ T-Zellen und höhere Anteile an T_{naive} sowie T_{eff} aufwiesen. Nach 7 Tagen Stimulation mit 'DC' oder 'MNC' waren die T-Zell Profile charakterisiert durch einen signifikanten Anstieg von aktivierten T-Zellen mit Effektorfunktion. Auch nach Stimulation zeigten die AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden geringere Anteile an aktivierten T-Zellen, β -Integrin⁺ T-Zellen und T_{cm} dafür höhere Anteile an T_{eff} . 64% der Fälle nach 'DC'-Stimulation wiesen im Vergleich zu 40% der Fälle nach 'MNC'-Stimulation antileukämische Zytotoxizität auf, was die Überlegenheit der 'DC' im Vergleich 'MNC' als Stimulatoren unterstreicht. Interessanterweise konnten wir dabei keinen *signifikanten* Unterschied der T-Zell-Profile zwischen 'DC'- und 'MNC'-stimulierten AML-Probanden feststellen. Die antileukämische Aktivität ging mit einem erhöhten Anteil an T_{cm} und T_{naive} vor Stimulation als auch höheren Anteilen von T_{cm} , aktivierten T-Zellen und β -Integrin⁺ T-Zellen nach 'DC'-Stimulation einher. Anhand unserer Daten war es erstmalig möglich, cut-off Werte für Aktivierungsmarker, Differenzierungsmarker und β -Integrin⁺ T-Zellen zu definieren, welche eine prädiktive Aussage über die antileukämische T-Zellantwort zulassen.

Zusammenfassend bestätigt diese Arbeit die bedeutende und zentrale Rolle der T-Zellen in der Immunantwort bei leukämischen Erkrankungen. Durch den Vergleich verschiedener T-Zell-Profile konnten wir einen weiteren Beitrag in der Charakterisierung und Detektion verschiedener T-Zell-Subtypen erbringen. Wir konnten erneut zeigen, dass die spezifische antileukämische T-Zell-Antwort durch 'DC'-Stimulation verbessert werden kann. Unsere Arbeit zeigt, dass AML Patienten mit hohen Anteilen an T_{cm} und T_{naive} vor Stimulation besonders von einer 'DC'-Stimulation profitierten. Verschiedene T-Zell-Subtypen konnten dabei als prädiktive Marker herausgearbeitet werden: Zellen von AML-Patienten mit hohen Anteilen an aktivierten T-Zellen, β -Integrin⁺ T-Zellen und T_{cm} nach 'DC'-Stimulation zeigten eine erhöhte antileukämische Funktionalität, was diese T-Zell-Subtypen zu interessanten Ansatzpunkten einer antileukämischen Immuntherapie machen könnte.

2. Einleitung

2.1 Definition, Ätiologie und Einteilung der Akuten Myeloischen Leukämie

2.1.1 Definition

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine neoplastische Erkrankung der Hämatopoese, welche durch klonale Proliferation und gestörte Zelldifferenzierung der myeloischen Zellreihen gekennzeichnet ist. Die Infiltration von Blut, Knochenmark und anderen Geweben durch hämatologische Vorläuferzellen, sog. ‚Blasten‘, führt zu einer Beeinträchtigung der Organfunktionen und unbehandelt zum Tode. Insbesondere im Knochenmark kommt es durch Verdrängung der anderen Zellreihen zu einer gestörten Erythro,-Leuko,-und Thrombozythopoese (Kriener, Fend, and Hansmann, 2008). Klinisch resultiert u.a. eine Anämie mit Abgeschlagenheit, eine erhöhte Blutungsneigung sowie eine erhöhte Infektneigung (Staib, 2009).

2.1.2 Epidemiologie

Laut der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) ist die AML eine eher seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von 3,8/100.000 pro Jahr (Stand August 2005), wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen (Vasu and Blum, 2013; Wetzler, Marcucci, and Bloomfield, 2012). Zwar kann es in allen Lebensabschnitten zu einem Ausbruch der Erkrankung kommen, jedoch steigt die Inzidenz mit steigendem Lebensalter von 2-3/100.000 bei jüngeren Patienten auf 13-15/100.000 bei 70-80 Jährigen (Burnett, Wetzler, and Lowenberg, 2011). Es findet sich ein eindeutiger Erkrankungsgipfel bei Patienten > 65 Jahren; somit ist die AML als eine Erkrankung des älteren Menschen anzusehen ist. Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose liegt bei 67 Jahren (Wetzler, Marcucci, and Bloomfield, 2012).

2.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Myeloische Leukämien werden je nach Verlauf und Voranschreiten der Erkrankung in akute und chronische Leukämien eingeteilt (Staib, 2009). Die Ätiologie ist noch nicht vollständig aufgeklärt und nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Nach derzeitigem Verständnis entstehen Akute Myeloische Leukämien höchstwahrscheinlich auf dem Boden spontaner Neumutationen, weshalb man nicht von einer direkten genetischen Disposition ausgeht.

Allerdings hat sich ein generell erhöhtes Risiko für eine leukämische Erkrankung bei familiärer Häufung von malignen Erkrankungen gezeigt, so dass doch von einer gewissen prädisponierenden Veranlagung ausgegangen werden muss. Geschwister eines an Leukämie erkrankten Kindes haben ein geringfügig erhöhtes Risiko (1,1-fache), wohingegen bei eineiigen Zwillingen ein Erkrankungsrisiko von immerhin 15% besteht (Creutzig and Reinhardt, 2006). Man geht davon aus, dass die Erkrankung von den Myeloblasten (unreife Vorläuferzellen der myeloischen weißen Blut-Zellreihe) ausgeht. Bei einer AML kommt es zu genetischen Veränderung einzelner myeloischen Vorläuferzelle was zu einer Stagnation ihrer Reifung führt. Diese Zelle differenziert nicht weiter und bleibt in einem funktionslosen Zustand. Weitere genetische Veränderung führen schließlich dazu, dass die Zelle beginnt unkontrolliert zu proliferieren, sich dem programmierten Zelltod entzieht und nicht differenziert was in einem Multi-Organ-Befall mit leukämischen Zellen resultiert (Licht and Sternberg, 2005). Tabelle 1 zeigt einige bekannte pathophysiologische Mechanismen und ihre Ursachen.

Eigenschaft	autonome Zellproliferation	Differenzierungsblock	Vermeidung Apoptose	Gesteigerte Selbsterneuerung	Verlust der Zell-Zyklus-Kontrolle	Dissemination
Molekulare Veränderung	Aktivierende Mutationen: Flt3, Ras, c-Kit, c-FMS, Jak2, PTPN11	Fusion von Transkriptionsfaktoren	AKT pathway Aktivierung	β-catenin Mutationen	P53 Dysfunktion	TNF Sekretion durch
	Inaktivierende Mutationen - NF1	Retinoic acid Rezeptor PML-RARα, PLZF-RARα	gefolgt von RTK Aktivierung führt zu Bad Deaktivierung	Aktivierung des Wnt Catenin pathways durch Fusion von Transkriptionsfaktoren	Verlust von Rb	leukämische Blasten
	Autokrine loops: (Trk-A Hochregulation durch RUNX1-MTG8)	Kern bindende Faktoren RUNX1-MTG8 CBFβ-MYH11 RUNX1-EVI1	P53 Mutationen in AML des Alters	aktivierte RTK pathways kooperieren um Selbsterneuerung zu induzieren	P15, P16 zyklinabhängige Kinase, Genmethylation	stimuliert das Endothelium.
		MLL-Fusionen	Dysregulation durch			Gesteigerte Selektin, Cadherin und Integrin Expression fördert Adhesion und Emigration durch Gefäße.
		Hox Genfusion und Überexpression	Fusionsproteine, NPM Mutationen			
		Punktmutationen von Transkriptionsfaktoren Pu.1, C/EBPα, RUNX1	Bcl2 Überexpression			

Tabelle 1 Pathophysiologische Ursachen eine AML und ihre molekularen Läsionen (Licht and Sternberg, 2005)

Selten ist eindeutig nachzuweisen welcher Mechanismus zu Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Veränderungen führte. Eine gehäufte Inzidenz wurde allerdings bei folgenden Risikofaktoren festgestellt: die Exposition radioaktiver, ionisierender Strahlung in hoher Dosis, wie es die gesteigerte AML-Inzidenz nach den Atomangriffen in Japan 1945 zeigte, sowie die chronische Exposition gegenüber Chemikalien wie Benzolen, Farbstoffen, Pestiziden, Petroleum. Aber auch chronischer Nikotinkonsum kann potenziell das Knochenmark schädigen und steht im Verdacht das Auftreten einer Leukämie zu begünstigen (Jabbour, Estey, and Kantarjian, 2006). Daneben können Zytostatika und eine Radiatio zur Behandlung einer soliden Tumorerkrankung, wie beispielsweise eines Lymphoms oder eines Gallengangskarzinomes, zu DNA-Veränderungen führen (Larson, 2007). In diesem Fall spricht man von einer sekundären AML (sAML) oder ‚therapy-related‘ AML (t-AML). So werden 2 typische Therapie-assoziierte sekundäre AML unterschieden: sAML nach Therapie mit Alkylanzien, z.B. Cyclophosphamid, die nach einer Latenz zwischen 4-8 Jahren auftreten oder nach Einsatz von Topoisomerasen II (z.B. Etoposid) nach einer Latenz von gewöhnlich 1-3 Jahren (Jabbour, Estey, and Kantarjian, 2006). Aber auch andere therapeutisch nutzbare Substanzen wie Chloramphenicol, Phenylbutazon, Chloroquine und Psoralen können zu einer Schädigung des Knochenmarkes führen und so eine AML begünstigen. Ebenso entstehen sAML auch auf dem Boden myelodysplastischer Prozesse mit chronischem Verlauf, wie beispielsweise dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) oder der Polycythemia vera und werden zudem vermehrt in Rahmen anderer Syndrome wie dem Down Syndrom, Klinefelter Syndrom, Fanconi-Anämie, Kostmann oder dem Wiskott-Aldrich Syndrom beobachtet (Jabbour, Estey, and Kantarjian, 2006).

2.2 Diagnostik, Klassifikation und Prognose der Akuten Myeloischen Leukämie

2.2.1 Diagnostik und Klassifikation

Liegt der Verdacht einer Erkrankung der Hämatopoese vor, wird diese an Hand von Anamnese, körperlichem Untersuchungsbefund, Blutbild, Differentialblutbild, Knochenmarkzytologie und –zytochemie, Knochenmarkbiopsie, Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik (z.B. NPM1, CEBPA, FLT3) diagnostiziert (Dohner et al., 2010; Vardiman et al., 2009; Wetzler, Marcucci, and Bloomfield, 2012). Seit 1976 versucht man eine einheitliche Klassifikation für die AML zu finden. Unter Berücksichtigung der Blastenzahl, dem Grad der Differenzierung und der Linienzugehörigkeit, basierend auf morphologischen, zytochemischen und immunphänotypischen Analysen wurde die AML in der French American British (FAB-) Klassifikation in AML M0- M7 eingeteilt (siehe Tab. 2)

(Bennett et al., 1985; Harris et al., 2000; Hayhoe, 1988). Klinische und prognostische Aspekte wurden jedoch in der FAB- Klassifikation nicht berücksichtigt, was sich in der klinischen Anwendung oftmals als unpraktisch herausstellte (Vardiman, Harris, and Brunning, 2002). Die Möglichkeit molekular- und zytogenetischer Analysen erweiterten zudem das Diagnostikspektrum sowie das Verständnis für die Pathogenese der Erkrankung und erlaubten eine genauere Prognose. Es zeigte sich, dass sich die gefundenen genetischen Anomalien nicht mit der auf der Morphologie basierenden FAB-Einteilung in Einklang bringen ließen, mit Ausnahme der akut promyelozyten Leukämie M3 welche eine typische Translokation t(15;17) aufweist. Lediglich die M3 und M4Eo AML zeigten prognostisch relevante zytogenetische Korrelationen mit dem FAB-Typ (Arber, 2001). Dazu ließ sich beobachten, dass bei einigen sAML und AML entstehend aus dem MDS im Gegensatz zu den de-novo Leukämien typische genetische Anomalien wie beispielsweise 3q-, -5, 5q-, -7, 7q-, +8, +9, 11q-, 12p-, -18,-19, 20q-, +21, t(1;7), (2;11) oder komplex aberrante Karyotypen auftraten (Harris et al., 2000). Darüber hinaus waren die Prognose und der klinische Verlauf dieser Patienten schlecht. All diese Erkenntnisse führten zu einer neuen Klassifikation, der WHO-Klassifikation, die sich primär an zytogenetischen Anomalien orientiert und klinische Parameter (u.a. die Krankengeschichte des Patienten) mehr gewichtet (Haferlach et al., 2003). Die WHO teilte die AML in 4 Hauptgruppen ein: AML mit rekurrenten zytogenetischen Translokationen, AML mit Dysplasie mehrerer Zellreihen, Therapie-assoziierte AML und andere nicht klassifizierte AML (Vardiman, Harris, and Brunning, 2002). Im weiteren Verlauf wurden diese Gruppen ergänzt (siehe Tabelle 3). Eine weitere Änderung war, dass bereits ein Blastenanteil von 20% im peripheren Blut für die Diagnosebestätigung ausreicht, da sich zeigte, dass Patienten mit einem Blastenanteil von 20-30% die gleiche Prognose wie Patienten mit einem Blastenanteil >30% aufweisen (Harris et al., 2000; Vardiman, Harris, and Brunning, 2002). Auch die WHO-Klassifikation wird regelmäßig den neuen Erkenntnissen angepasst. So wurden 2008 beispielsweise u.a. eine Reihe von neuen zytogenetischen Abnormalitäten, wie AML mit t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214* hinzugefügt, die Unterscheidung der Therapie-assoziierten AML entfiel und neue Kategorien wie Down-Syndrom-related myeloid proliferations wurden eingerichtet (Vardiman et al., 2009).

FAB-Subtyp	Bezeichnung	Morphologische Kennzeichen	Zytochemie (EST=Esterase, POX=Peroxidase)	Typische Zytogenetische Aberrationen	% der AML Erst-diagnosen (Haferlach et al., 2003)
M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung	Unreife Blasten ohne Granulation	POX < 3 %, EST negativ	-	3,3
M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	< 10 % reife Zellen (= Promyelozyten, Granulozyten, Monozyten)	POX o. SSB+ > 3 %, EST < 20 %	-	19,1
M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	≥ 10 % reife Zellen in der Myelopoese, < 20 % Monozyten	POX > 3, EST meist schwach positiv	t(8;21) (in ca. 20 %)	32,2
M3	Akute Promyelozyten-Leukämie	> 20 % hypergranulierte Promyelozyten (Auer Stäbchen)	POX > 3 % (meist stark positiv), EST schwach bis mäßig positiv	t(15;17), selten t(5;17), t(11;17)	4,9
M3v	Akute Promyelozyten-Leukämie, mikrogranuläre Form	-	-	t(15;17)	1,8
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie	> 20 %, Myeloische Zellen (Blasten, Promyelozyten) 20-80% monozytäre Zellen (Monoblasten und reife Formen)	POX > 3 %, EST > 20 %	-	16,9
M4 _{Eo}	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	> 5% Eosinophile	-	inv(16)	6,2
M5	Akute Monoblasten/Monozyten-Leukämie	> 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten	POX meist negativ bis leicht positiv, EST > 20 % (kräftig positiv)	-	
M5a	Akute Monoblasten-Leukämie	> 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten oder Promonozyten	POX meist negativ bis leicht positiv, EST > 20 % (kräftig positiv)	-	5,9
M5b	Akute Monozyten-Leukämie	< 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten, > 20 % Monozyten	POX meist negativ bis leicht positiv, EST > 20 % (kräftig positiv)	-	6,2
M6	Akute Erythroleukämie (Erythrämie)	> 50 % aller Zellen sind Erythroblasten oder > 30 % aller Blasten unter den nicht-erythrozytären Zellen sind Erythroblasten, häufig trilineäre Dysplasie	POX > 3 %, EST kann positiv sein Ringsideroblasten	-	3,3
M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie	Hochgradig pleomorphe Blasten	POX < 3 %, EST kann positiv sein	-	0,3

Tabelle 2 French American British (FAB-) Klassifikation der AML (Bennett et al., 1985)

Akute myeloische Leukämien mit rekurrenten genetischen Anomalien
<p>AML mit t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> APL mit t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i>* AML mit t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i>† AML mit t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i> AML (megakaryoblastic) mit t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> Vorläufige Entität: AML mit mutiertem <i>NPM1</i> Vorläufige Entität: AML mit mutiertem <i>CEBPA</i></p>
Akute myeloische Leukämien mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen
Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien
Akute myeloische Leukämie ohne weitere Kategorie (not otherwise specified, NOS)
<p>AML mit minimaler Differenzierung (FAB M0) AML ohne Ausreifung (FAB M1) AML mit Ausreifung (FAB M2) Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4) Akute monoblastäre/monozytäre Leukämie (FAB M5a, b) Akute Erythroleukämie (FAB M6) - reine Erythroleukämie - Erythroleukämie, erythroid/myeloid Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7) Akute Basophilenleukämie Akute Panmyelosis mit Myelofibrose (Syn.: akute Myelofibrose; akute Myelosklerose)</p>
Myeloisches Sarkom (Syn.: extramedullärer myeloischer Tumor; granulozytäres Sarkom; Chlorom)
Myeloische Proliferationen bei Down-Syndrom
<p>Transient abnormale Myelopoese (Syn.: Transientes myeloproliferatives Syndrom) Down Syndrom assoziierte myeloische Leukämie</p>
Blastische plasmazytoide dendritische Zell-Neoplasien
Akute Leukämien mit unklarer Linienzugehörigkeit
<p>Akute undifferenzierte Leukämie Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp und (v;11q23); <i>MLL</i>-Rearrangement Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, B/myeloisch, (nicht anderweitig spezifiziert) Akute Leukämie mit gemischtem Phänotyp, T/myeloisch, (nicht anderweitig spezifiziert) Vorläufige Entität: Natural killer (NK) Zell lymphoblastische Leukämie/Lymphom</p>

Tabelle 3 Die WHO-Klassifikation der AML aus dem Jahr 2008 (Dohner et al., 2010)

Trotz Einführung der WHO-Klassifikation findet die FAB-Klassifikation nach wie vor sowohl in wissenschaftlichen Arbeiten als auch im klinischen Alltag bei der Diagnosefindung der AML immer noch Beachtung (Haferlach et al., 2003). Hinzu kommt, dass zytogenetische

Analysen zwar wichtig und wünschenswert, im klinischen Alltag jedoch zum jetzigen Zeitpunkt leider noch nicht flächendeckend verfügbar sind (Vardiman, Harris, and Brunning, 2002). In dieser Arbeit wurde die FAB-Klassifikation verwendet.

2.2.2 Prognose

Der Erfolg der Therapie und damit die Prognose hängt sehr stark vom Alter des Patienten, dessen Co-Morbiditäten aber auch von der Zytogenetik ab (Haferlach et al., 2003). So können die Patienten an Hand zytogenetischer Analysen in 3 Gruppen eingeteilt werden: günstig, intermediär und ungünstig (Tabelle 4). Es zeigte sich, dass das zytogenetische Risiko mit dem Alter korreliert. So zeigen jüngere Patienten (<60 J.) eher ein günstiges, ältere Patienten (>60 J.) hingegen ein ungünstiges zytogenetisches Risikoprofil, (Burnett, Wetzler, and Lowenberg, 2011).

Risiko Gruppe	Zytogenetische Anomalien
günstig	t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)
Intermediär	Entitäten, die weder günstig noch ungünstig zuzuordnen sind
ungünstig	abb(3q) [ausschließlich t(3;5)(q21–25;q31–35)], inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) add(5q)/del(5q), -5 add(7q)/del(7q), -7 t(11q23) [ausschließlich t(9;11)(p21–22;q23) und t(11;19)(q23;p13)] t(9;22)(q34;q11) -17/abn(17p) Komplexer Karyotyp (≥4 unabhängige Anomalien)

Tabelle 4 Zytogenetische Risikogruppen für AML des Medical Research Council (Kuhn l and Grimwade, 2012)

2.3 Therapie

2.3.1 Induktions- und Konsolidierungstherapie

Die Behandlung setzt sich in der Regel aus 2 Behandlungsschritten zusammen: der Induktionstherapie mit dem Ziel einer vollkommenen Eradikation aller Blasten und dem

Erreichen der Vollremission (VR), gefolgt vom post-Remissions-Management (Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie), bei welchem der initiale Behandlungserfolg gesichert werden soll (Wetzler, Marcucci, and Bloomfield, 2012). Obwohl es sich bei der AML um eine sehr heterogene Erkrankung handelt, hat sich ein Standard Induktions-Schema bewährt, welches seit Jahren angewandt wird, wobei gewisse lokale Modifikationen bestehen (Fernandez, 2010). So werden in Deutschland Patienten mit Thioguanine, Cytarabine, und Daunorubicin [TAD] und hoch-dosiert Cytarabine and Mitoxanthrone [HAM]) in Kombination als TAD-HAM oder HAM-HAM behandelt (Stelljes et al., 2011), wohingegen in den USA das sog. „7+3“-Regime, bestehend aus einer Kombination von Cytarabin mit einem Anthracendion oder Anthracyclin, am meisten verbreitet ist (Dohner et al., 2010; Fernandez, 2010). Die Dosierung richtet sich weitgehend nach Alter und Risikogruppe des Patienten (Wetzler, Marcucci, and Bloomfield, 2012). Der Zusatz von anderen unterstützenden Medikamenten oder die Intensivierung der Cytarabin-Dosis führte partiell zu besseren Ergebnissen, ist aber auf Grund starker toxischer Nebenwirkungen nicht für jeden Patienten zuträglich und in der Regel nur für jüngere Patienten eine Option (Burnett, Wetzler, and Lowenberg, 2011). So findet sich beispielsweise eine Mortalität nach Induktionstherapie von 30-40% bei über 80-Jährigen, während unter 50-jährige nur eine Mortalität von 5-10% aufweisen (Jabbour, Estey, and Kantarjian, 2006). Durch die Induktionstherapie erreichen, abhängig vom Alter des Patienten 50-80% eine VR (Burnett, Wetzler, and Lowenberg, 2011). Von einer VR wird gesprochen, wenn ein Blastenanteil $<5\%$ im Knochenmark bei einer Thrombozytenzahl $\geq 100 \times 10^9/L$ und einer neutrophilen Granulozytenzahl von $\geq 1 \times 10^9/L$ erreicht werden (Jabbour, Estey, and Kantarjian, 2006). Allerdings erleiden 85% der älteren Patienten und 50% der jungen Patienten mit schlechter Prognose trotz Konsolidierungstherapie innerhalb von 3 Jahren einen Rückfall (Burnett, Wetzler, and Lowenberg, 2011). Die durchschnittliche 4 Jahres-Überlebensrate liegt somit bei nur 34% (Hengeveld et al., 2012). Der Grund für einen Rückfall liegt im Verbleib einer kleinen Anzahl an Leukämiezellen, die erneut proliferieren und ein Rezidiv auslösen können. Dies wird als ‚minimale Resterkrankung‘ (MRD) bezeichnet (Westers et al., 2006). Das Überwachen der MRD und frühzeitige Erkennen einer erneuten Proliferation der leukämischen Zellen ist ein entscheidender prognostischer Faktor geworden, welcher eine Änderung der Therapie, beispielsweise den Einsatz einer immunotherapeutischen Intervention notwendig machen kann (Miyazaki et al., 2012). Neuere technische Methoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Immunphänotypisierung der aberranten Blasten mittels

Durchflusszytometrie stehen als geeignete Instrumente hierfür zur Verfügung (DiNardo and Luger, 2012).

Um die Chancen auf eine dauerhafte Remission zu erhöhen muss sich eine Post-Remissionstherapie anschließen. Diese kann aus einer Chemotherapie, einer allogenen oder autologen Stammzelltransplantation bestehen (Giles et al., 2002). Laut dem National Comprehensive Cancer Network werden verschiedenen Ansätze, in Abhängigkeit des Schweregrades der Prognosegruppe verfolgt. Demnach sollen Patienten der günstigen Risikogruppe mit einer Chemotherapie und ggf. einer autologen SZT (Stammzelltransplantation), Patienten der ungünstiger Risikogruppe mit einer allogenen SZT behandelt werden, da diese ansonsten größtenteils einen Rückfall innerhalb von 6 Monaten erleiden (Kolb, Simoes, and Schmid, 2009; Stelljes et al., 2011). Für die Behandlung von Patienten der intermediären und ungünstigen Risikogruppe wurden alle 3 Therapien als gleich erfolgreich angesehen. Eine im Jahr 2009 im Journal of American Medical Association (JAMA) veröffentlichte Meta-Analyse konnte nun erstmals zeigen, dass eine allogene SZT einen Überlebensvorteil bei Patienten der intermediären und ungünstigen, aber nicht für Patienten der günstigen Risikogruppe haben (Koreth et al., 2009). Da die Versagensrate der Konsolidierungstherapie immer noch unbefriedigend hoch ist, geht die Suche nach zusätzlichen alternativen Therapieansätzen weiter. Monoklonale Antikörper wie Gemtuzumab oder Ozogamicin additiv zur Standardtherapie verabreicht haben die klinischen Verläufe nicht verbessert. Zwar konnte durch die Zugabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren die Dauer der Neutropenie verkürzt und damit die frühen Tode durch Infektionen verringert, als auch durch Supportiva die Verträglichkeit und damit die Dosierung der Chemotherapeutika erhöht werden. Insgesamt konnten diese Ansätze die klinischen Verläufe jedoch nicht verbessern (Fernandez, 2010). Die SZT ist bislang der einzige kurative Lösungsansatz, insbesondere im Falle eines Rezidivs (Kolb, 2008).

2.3.2 Stammzelltransplantation und Donor Lymphozyten Infusion

Es stehen 2 Varianten der Stammzelltransplantation zur Verfügung: die autologe SZT (der Patient bekommt eigene Stammzellen transplantiert) und die allogene SZT (der Patient bezieht Stammzellen von einem HLA (Humanes Lymphozyten Antigen)-identischen kompatiblen Spender) (Willemze et al., 2004). Die Stammzellen des Spenders können entweder direkt aus dem Knochenmark mittels multiplen Knochenstanzen aus dem Beckenkamm gewonnen, oder nach Mobilisierung der Stammzellen mit Granulocyte Colony-

Stimulating Factor (G-CSF) aus dem peripheren Blut entnommen werden. Der Vorteil letzteren Verfahrens ist, dass es sich im Vergleich zur Knochenstanze um einen für den Spender weniger schmerzhaften Eingriff handelt. Allerdings kann die G-CSF Behandlung vorübergehende Krankheitssymptome wie Fieber und Abgeschlagenheit auslösen, und mögliche Langzeitfolgen sind nicht auszuschließen. Trotzdem hat dieses weniger invasive Verfahren die Spendenbereitschaft der Bevölkerung stark verbessert. Bensinger et al. konnten zeigen, dass Stammzellen, welche aus peripheren Blut des Spenders gewonnen werden zu einer schnelleren Erholung des Blutbildes der Patienten im Vergleich zur Knochenmarkspende führen (Bensinger et al., 2001). Bei der Suche nach einem geeigneten Spender werden inzwischen nicht nur HLA-identische Geschwister in Erwägung gezogen, da sich zeigte, dass HLA-identische Fremdspender vergleichbare klinische Verläufe aufweisen. Auch haploide SZT- beispielsweise von Eltern auf ihre Kinder sind möglich (Kolb, Simoes, and Schmid, 2009). Im Allgemeinen lässt sich festhalten, dass die autologe SZT besser verträglich ist. Es kommt zu keinen Graft versus Host (GvH)-Reaktionen, jedoch werden im Vergleich zur allogenen SZT häufiger Rückfälle beobachtet (Soiffer, 2008; Willemze et al., 2004; Woiciechowsky et al., 2001). Die allogene SZT ist eine effiziente Behandlungsmethode für Patienten mit schlechter Prognose im fortgeschrittenen Stadium der AML und im Rezidiv der einzige kurative Behandlungsansatz. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die T-Zellen des Donors von Antigenen auf den Blasten aktiviert werden und diese lysieren (Graft versus Leukemia (GvL)-Effekt) (Woiciechowsky et al., 2001). Die Entstehung des GvL-Effektes ist nach wie vor nicht komplett geklärt. Vermutlich zeichnen, bei vorliegender HLA-Übereinstimmung, sogenannte „minor histocompatibility antigens“, welche auf allen Zelloberflächen exprimiert werden, verantwortlich für die GvL und GvHD (Ferrara et al., 2009). Es gilt als gesichert, dass T-Zellen eine wichtige Rolle spielen, wobei auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und B-Zellen mitwirken (Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009). Es ist denkbar, dass T-Zellen die Tumorzellen direkt via Granzym oder Perforin lysieren. Allerdings wird auch die Lyse via Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) oder Fas/Fas-Liganden-Interaktionen diskutiert (Soiffer, 2008). Limitiert wird dieser Ansatz von oftmals parallel auftretenden GvH-Reaktionen, bei denen T-Zellen des Spenders gegen gesundes Gewebe des Empfängers vorgehen und eine GvH-Erkrankung (GvHD) auslösen. Klinisch zeigen sich Symptome meist in Form von Exanthemen im Bereich der Haut, Diarrhöen im Bereich des Gastrointestinaltraktes oder Leberversagen bei Leberbeteiligung (Vogelsang, Lee, and Bensen-Kennedy, 2003). Bereits im Jahre 1979 erkannte die Gruppe Weiden, P. L., N. Flournoy, et al. einen signifikanten Zusammenhang

zwischen GvL und GvHD. Knochenmark-transplantierte Patienten *ohne* GvHD zeigten eine 2,5-fach höhere Rückfallquote im Vergleich zu transplantierten Patienten *mit* GvHD (Weiden et al., 1979). Es ist die große Herausforderung der Transplantationsmedizin eine Balance zwischen der GvL und der GvHD zu finden um eine gute Elimination der unerwünschten, proliferierenden leukämischen Zellen, bei gleichzeitig guter Verträglichkeit für ein breites Patientenkollektiv zu erreichen. Bisher ist es noch nicht gelungen die GvHD komplett von der GvL zu trennen. Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) zeigte sich, dass eine allogene SZT mit T-Zell depletiertem Graft keine GvHD zur Folge hatte. Nach Erreichen des Chimärismus, d.h. dem Installieren von Spenderzellen im KM des Patienten, konnte den Patienten zusätzlich Spenderlymphozyten (DLI) verabreicht werden, was die Rezidivrate auf Grund eines positiven GvL Effekts drastisch senkte. Bis zu 80% der CML-Patienten konnten so geheilt werden (Kolb, 2008). Die DLI ist somit ein ergänzender kurativer Behandlungsansatz für CML Patienten im Rezidiv nach SZT. Allerdings ist dieser Therapieansatz bei der AML im Vergleich zur CML weitaus weniger wirksam. Bei unter 20% der Fälle führte die DLI zu einer Heilung (Soiffer, 2008). Dies liegt vermutlich an der höheren Proliferationsrate der Blasten in der AML (Kolb, 2008). Mehr noch korreliert die Wirksamkeit und Verträglichkeit der DLI noch stark mit dem Alter (<37 J.), der Risikogruppe (günstige Risikogruppe), dem zeitlichen Auftreten des Rückfalls (>5 Monate), der Blastenmenge (<35% Blasten), und ist somit nur für einen kleinen Teil der Patienten eine Therapieoption (Kolb, Simoes, and Schmid, 2009; Schmid et al., 2007; Schmid et al., 2012a; Schmid et al., 2012b).

Um den Effekt der DLI zu verbessern wurden verschiedene Strategien erdacht: eine Chemotherapie vor der DLI, diverse Immuntherapien, Antikörper gegen Tumorantigene, sowie Infusionen von NK-Zellen (Kolb, Simoes, and Schmid, 2009; Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009; Soiffer, 2008).

2.3.3 Unterlaufen der Immunantwort

Leukämische Zellen können sich durch verschiedene Mechanismen der Wirkung von Chemotherapie bzw. der Kontrolle des Immunsystems entziehen: Beispielsweise kann die Aufnahme von Zytostatika in eine Zelle verringert bzw. die aktive Ausschleusung zu Resistenzen führen. Ein Defekt der Apoptose kann ebenfalls für das Überleben der Tumorzelle verantwortlich sein. Zudem können leukämische Zellen durch weitere Unterwanderungsmechanismen (Immunescape) der Eliminierung durch T-Zellen entgehen. Zum einen da Tumorantigene durch herunterregulierte MHC II-Moleküle auf leukämischen

Blasten zu schwach exprimiert sind oder aufgrund einer schwachen Co-Stimulation durch die Blasten. (Westers et al., 2006). Dies führt zu einer inadäquaten T-Zell Stimulation und somit zu T-Zell Anergie oder Toleranz (Westers et al., 2006). Des Weiteren wird vermutet, dass leukämische Zellen durch Sekretion von inhibitorischen Zytokinen wie IL-10 oder TGF- β ein immunsupprimierendes Mikromilieu schaffen (Duncan and Roddie, 2008). Grundsätzlich werden verschiedene immuntherapeutische Strategien zur Überwindung von Immunescapemechanismen herangezogen.

2.3.4 Immuntherapie

Ziel der Immuntherapie ist, den zuvor beschriebenen Immunescape rückgängig zu machen. Hauptsächlich wird dies durch die Aktivierung von NK-Killerzellen und Leukämie-spezifischen T-Zellen erreicht. Leukämie-spezifische T-Zellen sind T-Zellen, die gegen Leukämie-assoziierte Antigen (LAA) gerichtet sind. Idealerweise sind diese Antigene ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert, so dass kein körpereigenes Gewebe angegriffen wird. Prinzipiell wird zwischen einer passiven und aktiven Immuntherapie unterschieden. Die passive Immuntherapie beinhaltet den Transfer von *in-vitro* generierten Antikörpern oder Zellen (adoptive Immuntherapie/ DLI) wie beispielsweise NK-Zellen oder T-Zellen mit antileukämischen Funktionalität (Schmid et al., 2007; Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009; Vasu and Blum, 2013). Die Antikörper binden dabei an auf Blasten exprimierte Antigene (z.B. CD33) und induzieren mit dem F_c-Teil eine antikörpervermittelte Zellzytotoxizität oder das Komplementsystem. Eine Konjugation der Antikörper mit Radioisotopen oder Medikamenten (z.B. Gemtuzumab/Ozogamicin) können ihr Potenzial dabei stark erhöhen (Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009; Vasu and Blum, 2013). Im Gegensatz zur aktiven Immuntherapie wird bei der passiven Immuntherapie in der Regel kein Antigengedächtnis ausgebildet (Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009).

Bei der aktiven Immuntherapie wird eine Aktivierung und Proliferation tumorspezifischer T-Zellen *in-vivo* induziert. Dabei können Interleukine (z.B. Interleukin-2), Tumorpeptide (z.B. Wilms-Tumor 1 (WT1), Proteinase 3, oder Receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM)) transferiert werden (Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009). Nachteil der Gabe von Interleukin-2 ist eine teilweise beobachtete Thrombozytopenie. Bei der Gabe von Peptiden ist die eingeschränkte Verfügbarkeit von geeigneten LAA-Epitopen, eine kurze Halbwertszeit der HLA-peptid Komplexe sowie der mögliche Verlust der Antigenexpression

durch die leukämischen Zellen im Rahmen des Immunescapes zu befürchten (Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009).

Bei der Vakzination mit Zellen unterscheidet man die Tumorzell-Vakzination sowie die Transfusion von *in-vitro* modifizierten DC, Mononukleärer Zellen (MNC) oder Blasten.

Die effizienteste Aktivierung der T-Zellen erfolgt durch DC. Sie exprimieren neben diversen LAA auch co-stimulatorische Signale, die sie für eine optimale T-Zell Stimulation benötigen (Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009). Mehrere *in-vitro* Möglichkeiten DC, die leukämische Antigene präsentieren, herzustellen wurden über die Jahre beschrieben. Es gibt zunächst den Ansatz DC mit Peptiden oder Tumorzelllysate beladen. Ein Beispiel hierfür wäre das Genprodukt von PML-RAR α . Das Problem hierbei ist, dass nicht für jedes AML ein Peptid zur Verfügung steht, als auch dass eine Antigen-Drift zu befürchten ist (Duncan and Roddie, 2008; Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009; Westers et al., 2006).

Tumorzelllysate können zum Einsatz kommen, falls kein Antigen bekannt ist. Dabei wird jedoch in Kauf genommen, dass das Antigen nicht Leukämie-spezifisch ist und es so zu Autoimmunreaktionen kommen kann (Duncan and Roddie, 2008; Westers et al., 2006). Bei einem anderen Ansatz wird RNA in die DC eingebracht, die ein Tumorantigen kodiert. Dieser Ansatz bietet eine große Auswahl an Epitopen für MHC I als auch MHC II. Allerdings ist die Ausführung dieses Ansatzes sehr störungsanfällig (Westers et al., 2006). Bei einem ‚Hybrid-Modell‘ werden DC mit Tumorzellen fusioniert. Dabei können sowohl bekannte als auch unbekannte Antigene auf die DC übertragen werden. Jedoch hat sich auch die Herstellung eines Hybrides als komplexer und nicht immer reproduzierbarer Vorgang erwiesen (Westers et al., 2006).

Die wohl eleganteste Möglichkeit stellt die Generierung von DC aus leukämischen Blasten dar. Dabei macht man sich zu Nutze, dass Blasten und DC von denselben myeloischen Vorläuferzellen abstammen. Wie auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es möglich ist Blasten unter Einsatz von Zytokinen, wie zum Beispiel GM-CSF, SCF, Flt3-L, IL-3, IL-4 und TNF- α in sogenannte leukemia-derived DC oder DC leukämischer Abstammung (‘DC’ oder DC_{leu}) auszudifferenzieren (Houtenbos et al., 2003; Kremser et al., 2010; Westers et al., 2006). Es zeigte sich, dass diese ‘DC’ in der Lage sind, die T-Zell Anergie zu überwinden und die T-Zellen soweit zu stimulieren, dass diese Blasten lysieren (Grabrucker et al., 2010; Kremser et al., 2010; Li et al., 2006; Smits, Berneman, and Van Tendeloo, 2009). Ein zusätzlicher Vorteil dieser Methode im Gegensatz zu antigenbeladenen DC ist dass multiple leukämische Antigene präsentiert werden können (Schmetzer et al., 2007). Allerdings gelang dies nicht in allen Fällen, im Gegenteil zeigte sich in manchen

Fällen sogar eine stärkere Proliferation der Blasten (Roddie et al., 2006; Schuster et al., 2008). Die genauen Umstände darüber sind bisher nicht bekannt. Möglicherweise verhindern regulatorische T-Zellen eine zuverlässige Blasten-Elimination, oder es findet keine ausreichende Stimulation und Bildung von zytotoxischen T-Zellen statt (Roddie et al., 2006).

2.4 Antigenpräsentation über Dendritische Zellen und T-Zellaktivierung

2.4.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind Antigen Präsentierende Zellen (APC) und spielen eine entscheidende Rolle in der T-Zellaktivierung. Sie entstammen der myeloischen Zellreihe und zirkulieren in unreifer Form im peripheren Gewebe, wo sie Pathogene oder leukämie-assoziierte Antigene durch Phagozytose aufnehmen und prozessieren (Duncan and Roddie, 2008). Daraufhin begeben sich die DC, geleitet von Integrinen und Chemokinen in den afferenten Lymphbahnen in die sekundären Lymphorgane. In den Lymphknoten treffen sie auf naive T-Zellen oder zentrale Gedächtniszellen (T_{cm}), welche sie aktivieren (Sheridan and Lefrancois, 2011). Die aktivierten T-Zellen verlassen die Lymphknoten via den efferenten Lymphbahnen, folgen der Zirkulation bis zum Ductus Thoracicus, der in das venöse System mündet. Durch ihre Fähigkeit der Migration, Antigenpräsentation sowie der Sekretion von T-Zell stimulierenden Zytokinen sind DC idealer Vermittler von Antikörperantworten und das zentrale Ziel von Immuntherapien (Duncan and Roddie, 2008).

2.4.2 T-Zell DC Interaktion

T-Zellen sind als Teil des adaptierten Immunsystems dazu ausgebildet ausschließlich von professionellen APC (B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen) aktiviert zu werden (Sille, Visser, and Boes, 2005). Die Aktivierung und Proliferation von naiven T-Zellen, aber auch von Gedächtniszellen wird durch den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) vermittelt (Sharpe, 2009). Das Antigen wird von den APC durch die major histocompatibility complex (MHC) dargeboten (Redmond, Ruby, and Weinberg, 2009), wobei MHC I mit CD8+ T-Zellen und MHC II mit CD4+ T-Zellen interagieren (Duncan and Roddie, 2008). Für eine suffiziente T-Zell Stimulation ist jedoch nicht nur eine Antigenpräsentation via den MHC I und II Voraussetzung, sondern es müssen von der APC auch co-stimulatorische Signale übertragen werden („2 signal theory“) (Boesteanu and Katsikis, 2009; Duncan and Roddie, 2008; Redmond, Ruby, and Weinberg, 2009; Woiciechowsky et al., 2001). Zu diesem

Zwecke bildet sich zwischen der T-Zelle und der APC eine sogenannte „Antigen-Brücke“, bestehend aus Rezeptoren der CD28 oder TNF/TNFR Familien auf T-Zellen mit Molekülen auf APC aus. Eine Reihe von co-stimulatorischen Rezeptoren konnten mittlerweile identifiziert werden, wie z.Bsp. CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1 (Programmed Death-1) und BTLA (B and T cell lymphocyte attenuator), welche mit B7-1, B7-2, B7h B7H-1, HVEM auf APC interagieren. Weitere co-stimulatorische Rezeptorenpaare der TNF/TNFR Familie, die für eine erfolgreiche T-Zell Aktivierung benötigt werden sind beispielsweise OX-40:OX40L, CD27:CD70, 4-1BB:4-1BBL, CD30:CD30L, GITR:GITRL und HVEM:Light (Boesteanu and Katsikis, 2009; Crawford and Wherry, 2009; Sharpe, 2009).

Der wohl am besten erforschte co-stimulatorische Rezeptor ist CD28. CD28 wird konstitutiv auf T-Zellen exprimiert und bindet an die Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), welche von APC dargeboten werden. Durch dieses Signal werden T-Zellen zur Produktion von IL-2 und die Expression des Rezeptors CD25 angeregt, was eine auto- und parakrine stimulatorische Wirkung auf T-Zellen hat (Wang and Chen, 2004). Dies hat zur Folge, dass T-Zellen durch Herabsetzen der Aktivierungsschwelle des TCR leichter zu aktivieren sind, proliferieren, differenzieren und anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-xL exprimieren (Redmond, Ruby, and Weinberg, 2009). Fehlen diese co-stimulatorischen Signale unterbleibt die T-Zell Differenzierung, was zu T-Zell-Anergie oder T-Zell-Tod und somit zu einer Immuntoleranz führt (Redmond, Ruby, and Weinberg, 2009; Rudd, Taylor, and Schneider, 2009). Neue Forschungsergebnisse konnten zeigen, dass CD28 auch für die Aktivierung von Memory Zellen benötigt wird (Boesteanu and Katsikis, 2009).

Neben den aktivierenden Signalen werden auch inhibitorische Signale über die oben beschriebenen Bindungen zwischen T-Zellen und APC übertragen. Auf diese Weise werden T-Zellen positiv und negativ reguliert (Crawford and Wherry, 2009). Als eine Art Gegenspieler des CD28 kann CTLA-4 (CD152) betrachtet werden. Dieser wird auf aktivierten T-Zellen gefunden und interagiert ebenfalls mit CD80 und CD86 (Seliger et al., 2008). CTLA-4 (CD152) besitzt eine 10-100 fach höhere Affinität zu CD80/CD86 als CD28 und eine inhibitorische Wirkung auf die TCR und den CD28 Signalweg. Auf diese Weise wird die Immunreaktion gezielt reguliert (Seliger et al., 2008). In CTLA-4 wird großes Potential für die Behandlung von T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen, Allergien, Transplantationsabstoßungsreaktionen oder Asthma gesehen (Wang and Chen, 2004). Abbildung 1 zeigt schematisch die T-Zell Aktivierung durch eine APC mit einem Teil der co-Stimulatorischen Rezeptoren:

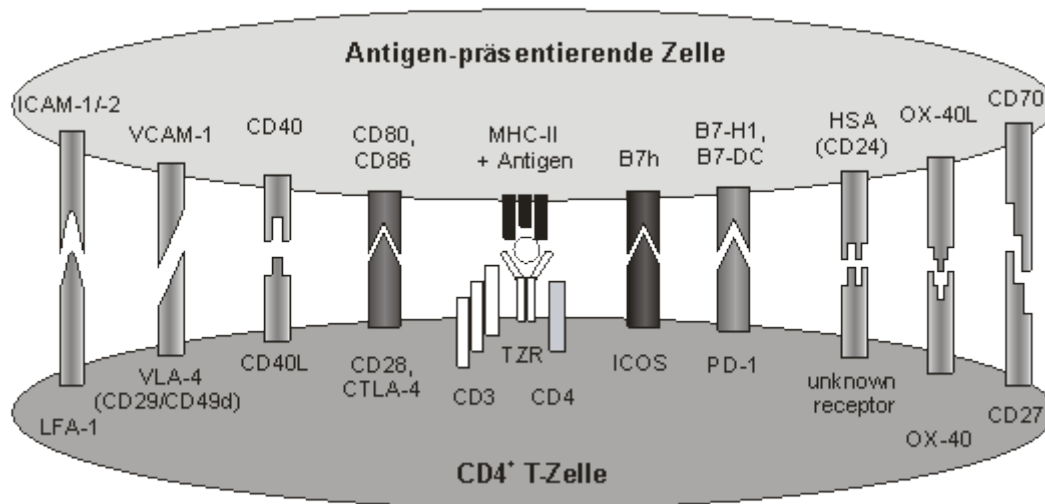


Abbildung 1 Co-stimulatorische Antigenbindungen bei T-Zell DC Interaktion. Quelle: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/schrage-arnhild-2006-07-07/HTML/image002.gif> Entnommen aus der Dissertation mit dem Titel Interaktion von T-Zellen mit sinusoidalen Endothelzellen der Leber von Diplom-Biologin Arnhild Schrage, Seite 10 (abgerufen 08.07.2015)

2.4.3 T-Zell Differenzierungsstadien

Naive T-Zellen und Effektor T-Zellen

Wird eine naive T-Zelle (T_{naive}) im Kontext einer Immunreaktion stimuliert proliferiert sie und ändert ihren Phänotyp, sie „differenziert“ (MacLeod et al., 2011). Oberflächenmarker, die der Anheftung an lymphatisches Gewebe oder der Interaktion mit APC dienen, werden zugunsten von Oberflächenantigenen herunterreguliert, welche zum Emigrieren in peripheres, entzündetes Gewebe benötigt werden oder Effektorfunktionen erfüllen. Das Emigrieren in peripheres Gewebe ist ein in mehreren Stufen verlaufender Prozess. Dabei kommt es zunächst zu dem sogenannten ‚rolling‘, wobei die T-Zellen langsam entlang den vaskulären Endothelzellen streifen. Die Flussgeschwindigkeit ist dabei so verlangsamt, dass es durch endothelständige Liganden zu einer weiteren Aktivierung und einer festen Adhäsion der T-Zellen an die Endothelzellen kommt. Vermittelt wird das ‚rolling‘ und die feste Adhäsion u.a. durch P-/E-/L-Selektine, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, MAdCAM-1, VCAM-1 und VLA-4 (Kruger and Mooren, 2007). Derart gebunden, verbleiben die T-Zellen an ihrem Ort und durchwandern das Endothel um in das Gewebe einzudringen in welchem sie als Effektorzellen (T_{eff}) aktiv werden.

Gedächtnis T-Zellen

Zusätzlich zu naiven und Effektor T-Zellen werden im Rahmen einer Immunreaktionen Gedächtnis T-Zellen gebildet. Gedächtnis T-Zellen sind Teil des adaptiven Immunsystems, welcher Langzeitimmunität ermöglicht. Sie werden nach dem erstmaligen Kontakt mit einem Antigen gebildet und sind die einzigen Zellen einer Immunantwort, die nicht der Apoptose

unterliegen (MacLeod et al., 2011). Kommt der Organismus erneut mit dem Antigen in Kontakt, kann dank der Gedächtnis T-Zellen eine schnellere und stärkere Immunantwort ausgelöst werden (Sekundäre Immunantwort). Dies kommt dadurch zustande, dass Gedächtniszellen im Vergleich zu naiven T-Zellen eine geringere Stimulationsschwelle und ein höheres Proliferationspotential zeigen (MacLeod et al., 2011; Roberts, Ely, and Woodland, 2005). Zudem ist die Anzahl der Gedächtniszellen höher als die der T_{naive} , so dass die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von Antigen und Antigen-spezifischer T-Zelle zunimmt (MacLeod et al., 2011)

Sallusto et al. teilten die Memory Zellen je nach Oberflächenprofil in 2 Subtypen ein. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{cm}) und Effektor Gedächtnis-T-Zellen (T_{em}), welche an Hand des Oberflächenexpressionsmusters für Lymphknoten- und Gewebsadhäsionsrezeptoren, einer typischen Zytokinsekretion und des Proliferationsverhaltens unterschieden werden können. T_{cm} exprimieren, ähnlich den naiven T-Zellen, die Oberflächenantigene CCR7 und CD62L, welche für den Übertritt aus dem Blut in sekundäres Lymphatische Gewebe benötigt werden, wohingegen T_{em} Rezeptoren für die Emigration in entzündetes Gewebe exprimieren, wie beispielsweise das Integrin $\beta 2$ oder $\beta 3$. Für die Unterscheidung von naiven T-Zellen eignen sich CD45RO oder CD45RA, welche auf aktivierten T-Zellen exprimiert werden (Fallen et al., 2003; MacLeod et al., 2011). Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Subpopulationen hinsichtlich ihrer Zytokinsekretion. So sezernieren T_{cm} u.a. IL-2, welches für die auto- und parakrine T-Zellstimulation und Proliferation benötigt wird, T_{em} hingegen sezernieren mit IL-4, IL-5 und IFN- γ pro-inflammatorische Zytokine mit Effektorfunktionen, die von T_{cm} nicht sezerniert werden (MacLeod et al., 2011; Sallusto, Geginat, and Lanzavecchia, 2004). Die beiden Subpopulationen unterscheiden sich also sowohl in Funktion als auch in ihrer Verteilung im Körper. Gemeinsam haben sie, dass sie im Vergleich zu naiven T-Zellen effizienter und schneller über den T-Zell-Rezeptor stimuliert werden können und dass beide Subpopulationen über Jahre im Körper unabhängig voneinander nachgewiesen werden können (Sallusto et al., 1999). Dies liegt an der erhöhten Affinität des T-Zell-Rezeptors zum Antigen. Jedoch erscheinen sie abhängiger von einer funktionierenden Stimulation via DC zu sein (Boesteanu and Katsikis, 2009).

Die Rolle der T_{cm} und T_{em} ist nach wie vor nicht im Detail verstanden und Gegenstand der Forschung. Es gibt Hinweise darauf, dass T_{cm} auf Grund ihres hohen Proliferationspotentials als regenerativer Pool, der im Sinne einer Homeostase eine Aufrechterhaltung der T_{eff} gewährleistet, angesehen werden können, wohingegen T_{em} , welche Effektorzytokine wie IFN- γ sezernieren eine schnellere sekundäre Immunantwort auslösen (Harris et al., 2002;

Hengel et al., 2003; Reinhardt et al., 2001; Roberts, Ely, and Woodland, 2005; Wherry et al., 2003).

Über die Entstehung der Gedächtniszellen herrscht Uneinigkeit. Ältere Untersuchungen legen nahe, dass ein paar wenige Effektorzellen nach der Beendigung der Immunreaktion nicht in Apoptose übergehen, sondern zu Gedächtniszellen umgewandelt werden. Neuere Untersuchungen zeigen, dass Gedächtniszellen in Abhängigkeit von Stärke und Dauer des Stimulus direkt aus naiven T-Zellen und unabhängig von Effektor T-Zellen entstehen können (Gerlach, van Heijst, and Schumacher, 2011; Manjunath et al., 2001; Sallusto, Geginat, and Lanzavecchia, 2004; Wherry et al., 2003). Je länger und stärker ein Stimulus auf die naive T-Zelle wirkt, desto weiter differenziert sie, wobei die Reihenfolge der Differenzierung $T_{\text{naive}} \rightarrow T_{\text{cm}} \rightarrow T_{\text{em}} \rightarrow T_{\text{eff}}$ lautet. Es hat sich gezeigt, dass mit steigender Differenzierung das Proliferationspotential, das Ansprechen auf homeostatische Zytokine, die Telomerlänge und die IL-2 Produktion abnehmen, wohingegen die Effektorfunktionen wie Perforine oder proinflammatorische Zytokine zunehmen, wie Abbildung 2 zeigt. (Klebanoff, Gattinoni, and Restifo, 2006; Prezzemolo et al., 2014).

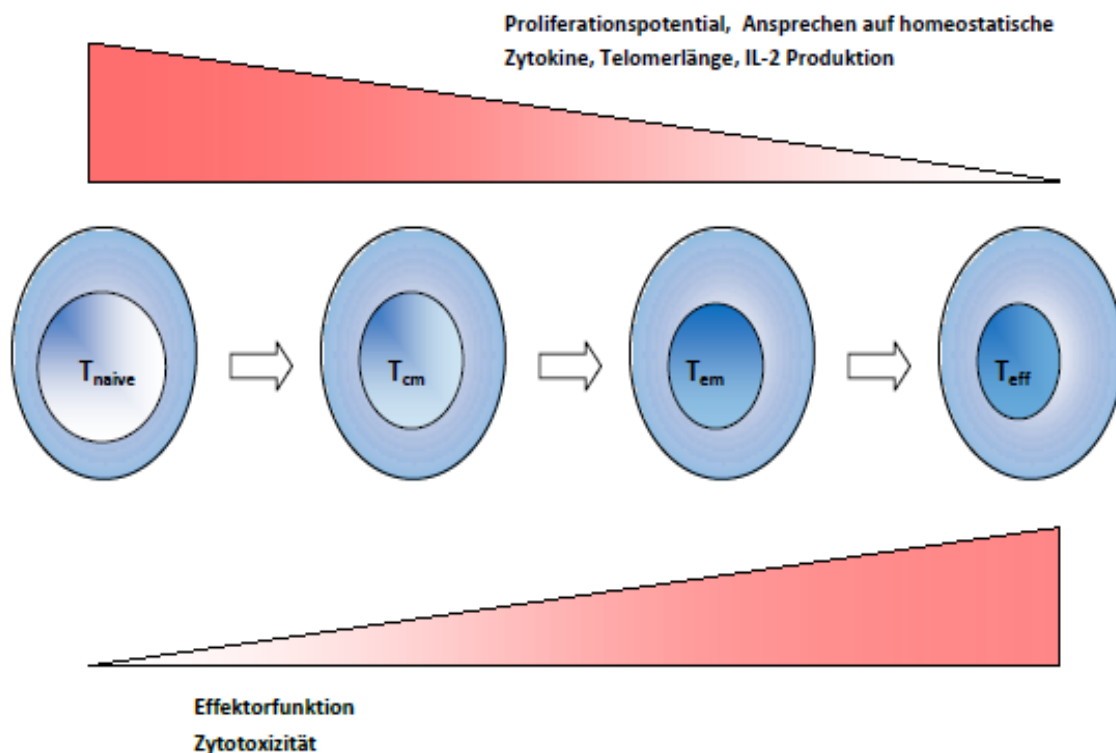


Abbildung 2 Differenzierungsstadien der T-Zellen von naiven T-Zellen zu Effektor T-Zelle. In Abhängigkeit von Dauer und Stärke des Stimulus entstehen T_{cm} , T_{em} oder T_{eff} . Mit steigendem Differenzierungsgrad nehmen

Proliferationspotential und das Ansprechen auf homeostatische Zytokine ab, wohingegen die Effektorfunktion zunimmt (Klebanoff, Gattinoni, and Restifo, 2006).

In jüngster Vergangenheit wurde die Existenz einer weiteren Subpopulation postuliert. Dabei handelt es sich um sogenannte Gedächtnis-Stammzellen (T_{scm}), welche einen den T_{naive} ähnlichen Phänotyp besitzen, aber eine hohe Expression an CD95 aufweisen, der regelmäßig auf Gedächtniszellen zu finden ist (Prezzemolo et al., 2014).

2.4.4 Charakterisierung von T-Zellsubtypen an Hand von Oberflächenantigenen

Mehrere Arbeitsgruppen haben sich mit der Charakterisierung von T-Zellsubtypen anhand ihres Antigenprofils beschäftigt. Dabei wurde eine Reihe von Oberflächenantigenen verwendet. Im Folgenden sollen die von uns verwendeten Oberflächenantigene in Kürze dargestellt werden:

CD3

CD3 ist ein Proteinkomplex, der sich aus 4 Polypeptidketten zusammensetzt (1x Gammakette, 1x Deltakette und 2x Epsilonketten) und auf T-Lymphozyten exprimiert wird. Zusammen mit dem TCR bildet CD3 den TCR/CD3 Komplex. Über diesen werden spezifische Antigene erkannt und T-Zellen aktiviert. Auf Grund seiner Spezifität für T-Zellen und seines Vorkommens in allen Stadien der Differenzierung ist CD 3 der gängige Oberflächenmarker von T-Zellen.

CD4

CD 4 ist ein Glykoprotein und Mitglied der Immunoglobulin Superfamilie. Es wird auf T-Zellen exprimiert und fungiert als Co-Rezeptor des T-Zell-Rezeptors in der Interaktion mit APC. Dabei bindet CD4 an MHC II. In der Folge verstärkt es die Aktivierungskaskade der T-Zellen (Prezzemolo et al., 2014). $CD4^+$ T-Zellen werden auch als Helferzellen bezeichnet.

CD8

CD8 ist ein heterodimeres, transmembranes Glykoprotein, welches sich aus einer α - und β -Kette zusammensetzt und auf T-Zellen exprimiert wird. Es fungiert als Co-Rezeptor für den T-Zell-Rezeptor und interagiert mit MHC I, welcher von allen kernhaltigen Zellen des Körpers dargeboten wird (Prezzemolo et al., 2014). Über den MHC I präsentieren die Zellen zelleigene Proteine und weisen sich den T-Zellen auf diese Weise als körpereigen aus. Ist eine Zelle virusbefallen oder entartet, werden prozessierte Proteine über den MHC I dargeboten, so dass interagierende $CD8^+$ T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen aktiviert werden und die Zielzelle zerstören. $CD8^+$ T-Zellen werden auch zytotoxische T-Zellen genannt (obwohl sie auch supprimierende Funktion haben).

CCR7

CCR7 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor und findet sich u.a. auf Gedächtnis-T-Zellen (Sallusto et al., 1999; Sheridan and Lefrancois, 2011). Die Liganden von CCR7, CCL19 und CCL21, werden insbesondere auf den hochendothelialen Venolen (HEV) der Lymphknoten exprimiert. Die Aktivierung via CCR7 führt zu einer Migration der T-Zellen in sekundäres lymphatisches Gewebe (Noor and Wilson, 2012).

CD45RO

Die Protein Tyrosin Phosphatase CD45 ist ein häufiges Oberflächenmolekül auf hämatopoetischen Zellen. Durch die Dephosphorylation der Src-Kinase und negativen Regulation der JAK-Kinase spielt CD45 eine Schlüsselrolle in der Antigen-Signalkaskade in T- und B-Lymphozyten (Cario et al., 2014). Es existieren viele verschiedene Isoformen, wobei CD45RA auf T_{naive} und CD45RO auf T_{non-naive} exprimiert wird (MacLeod et al., 2011; Sallusto et al., 1999).

CD27

CD27 ist ein transmembranes Homodimer und Mitglied der TNFR-Familie und wird ebenfalls auf T-Zellen exprimiert. Ähnlich dem CD28 spielt CD27 als Vermittler von co-stimulatorischen Signalen eine Rolle in der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen (Denoeud and Moser, 2011). Im Rahmen der T-Zellaktivierung wird die Expression von CD27 auf T-Zellen herunterreguliert, so dass sich CD27 gut zur Unterscheidung von T-Effektorzellen und nicht-Effektorzellen eignet (Fallen et al., 2003; Klebanoff, Gattinoni, and Restifo, 2006).

2.4.5 T-Zell Aktivierung

Die T-Zell-Aktivierung kann durch typische Aktivierungsmarker auf der Oberfläche der T-Zelle nachgewiesen werden. Im Folgenden werden die von uns verwendeten Aktivierungsmarker in Kürze vorgestellt:

CD154

CD154, auch bekannt als TRAP, T-BAM, CD40 Ligand, ist ein Typ II Transmembran Glykoprotein der TNF Superfamilie und bildet mit dem Rezeptor CD40 ein Liganden-Rezeptor Paar. Zunächst wurde das Vorkommen von CD154 vornehmlich auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen beschrieben, wodurch ihm eine bedeutende Funktion in der T-Zell vermittelten B-Zell Aktivierung zugesprochen wurde. Neuere Untersuchungen konnten jedoch auch die Expression von CD154 auf B-Zellen und DC nachweisen. Dementsprechend konnte eine CD40 Expression auch auf aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ Zellen detektiert werden. Die Aktivierung via CD154/CD40 führt zu einer Zunahme der Expression von CD80/86 auf

DC, sowie der Sekretion von IL-12, welches wiederum zu einer Differenzierung zu Th1-Zellen und der Produktion von IFN- γ führt (Ma and Clark, 2009).

CD69

CD69 ist ein Typ II Membran Glykoprotein und Mitglied der C-Typ Lektin Familie. CD69 ist ein früher Lymphozytenaktivierungsmarker (Lio et al., 1996), der allerdings auch auf allen anderen im Knochenmark vorkommenden Zellen im Rahmen einer Aktivierung exprimiert wird, nicht jedoch auf ‚ruhenden‘ Zellen (Sancho, Gomez, and Sanchez-Madrid, 2005; Shipkova and Wieland, 2012). Die Funktion dieses Oberflächenmarkers ist nicht ganz geklärt. Studien konnten zeigen, dass die Stimulation von CD69 zu einer erhöhten Proliferation und Produktion von IL-2, IFN- γ und TNF- α führt. So kann CD69 als Mediator des proinflammatorischen ‚signal pathways‘ betrachtet werden (Sancho, Gomez, and Sanchez-Madrid, 2005). Darüber hinaus konnten CD8⁺CD69⁺ T-Lymphozyten im Endomyokardium eines Herztransplantates gefunden werden, die eine Abstoßung des Transplantates verursachten. Diese und weitere ähnliche Erkenntnisse, ermutigten Wissenschaftler CD69 als Marker für aktive, alloreaktive Spenderlymphozyten zu verwenden. 2006 konnten u.a. Hartwig et al. zeigen, dass alloreaktive Spender T-Zellen durch magnetisches ‚cell sorting‘ aus einem Stammzelltransplantat oder einer DLI isoliert werden können (Hartwig et al., 2006). Auf der anderen Seite wurde berichtet, dass CD69 ebenfalls eine Rolle in der Beendigung der Immunreaktion durch die Anregung der Produktion von TGF- β spielt. Daher gilt CD69 als ein pleiotropischer Rezeptor mit einer dualen immunregulatorischen Funktion (Sancho, Gomez, and Sanchez-Madrid, 2005).

CD71

CD71 ist ein Transferrin Rezeptor und wie CD 69 ein Typ II Membran Glykoprotein. Er bindet Fe(Apo)-transferrin und transportiert das für Zellwachstum benötigte Eisen via Endozytose in die Zelle (Aisen, 2004; Luck and Mason, 2012). Er findet sich nicht auf ruhenden Leukozyten, wird jedoch auf aktivierten T-Zellen exprimiert bzw. auf jeder Zelle, die in die Proliferation eintritt hochreguliert (Nguyen et al., 2003; Shipkova and Wieland, 2012). Nguyen et al. konnten zeigen, dass CD71 ein geeigneter Marker für die Messung der Proliferation von T-Zellen in gemischten Lymphozytenkulturen (MLC) ist und ein Expressionsmaximum an Tag 7 aufweist (Nguyen et al., 2003).

CD137

CD137, auch 4-1BB, ist ein Mitglied der TNF Rezeptor Superfamilie, welches auf T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, sowie auf myeloischen Zellen exprimiert wird (Langstein, Michel, and Schwarz, 1999). Aktiviert von seinem Liganden CD137L, einem Typ II Membranprotein,

welche sowohl von APC als auch von Tumorzellen exprimiert wird, spielt CD137 eine wichtige Rolle in der T-Zell-Aktivierung und dem Überleben von T-Zellen (Wang et al., 2009). CD137 vermittelte Signale kooperieren mit TCR-vermittelten Signalen und verstärken so die Proliferation und Entwicklung zu Effektor-T-Zellen (Scholl et al., 2009; Sharpe, 2009). Houtenbos et al. konnten zeigen, dass das Zugeben von 4-1BBL in eine MLC bestehend aus T-Zellen und 'DC' zu einer gesteigerten Differenzierung zu Memory- und Effektor-T-Zellen mit einer erhöhten INF- γ Sekretion führte (Houtenbos et al., 2007).

2.5 Integrine

Integrine sind transmembrane Zellrezeptoren, welche sich aus nichtkonvalent gebundenen α - und β -Untereinheiten zusammensetzen. Sie werden von nahezu allen Zellen des Körpers mit Ausnahme der Erythrozyten, exprimiert und erfüllen eine Reihe von Funktionen, u.a. in der Zelladhäsion oder Signaltransduktion. In Lymphozyten dienen sie der Migration in entzündetes Gewebe, dem Erkennen von fremden Antigenen, der Zellproliferation und dem Überleben der Zelle (Kamiguchi et al., 1999). So nutzen beispielsweise sowohl T_{naive} als auch T_{eff} $\alpha 4\beta 7$ für die Migration aus peripheren Blutgefäßen in lymphatisches Gewebe des Gastrointestinaltraktes (GIT). Dabei bindet $\alpha 4\beta 7$ Integrin an Mucosal Adressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1), welches konstitutiv auf den Hochendothelialen Venen (HEVs) der lymphatische Gewebe, den mesenterialen Lymphknoten oder den Peyer Plaques, exprimiert wird. Gedächtnis-T-Zellen nutzen analog das Integrin $\alpha E\beta 7$, welches mit dem E-cadherin interagiert. (Gorfu, Rivera-Nieves, and Ley, 2009; Hamann et al., 1994; Shaw and Brenner, 1995). Anders als $\alpha 4\beta 7$, welches vor allem für die Migration in lymphatisches Gewebe des Gastrointestinaltraktes benötigt wird, ist $\alpha 4\beta 1$ an der Leukozytenmigration in diverse Gewebe beteiligt, u.a. in das Knochenmark, entzündete Gewebe oder follikuläres Gewebe (Kang et al., 2011). Kuklin et al konnten zeigen, dass $\alpha 4\beta 7$ den Transport der T-Zellen in das GIT-Gewebe vereinfacht, auch wenn $\alpha 4\beta 7$ nicht für eine suffiziente Immunreaktion benötigt werden (Kuklin et al., 2000).

Daneben zeigte sich, dass die Zelladhäsion von T-Zellen an extrazelluläre Matrix via $\beta 1$ -Integrin als co-stimulatorisches Signal für T-Zell-Rezeptor abhängige T-Zellproliferation und IL-2 Produktion fungiert (Kamiguchi et al., 1999). Zudem wird der Eintritt bzw. der Verbleib von T-Zellen im Knochenmark durch $\beta 1$ -Integrin vermittelt. Dabei wird die T-Zelle via $\beta 1$ -Integrin von VCAM-1 exprimierenden Stromazellen des Knochenmarks gebunden. Jene Stromazellen erfüllen durch Sekretion von IL-7 darüber hinaus auch homeostatische Funktionen für Gedächtnis T-Zellen (DeNucci and Shimizu, 2011).

Name der T-Zellen Subpopulation	Abkürzung	Oberflächenmarkerprofil	Kurzcharakterisierung	Referenz
naive T-Zellen	T naive	CCR7+,CD45RO-,CD3+	ungeprimte T-Zellen	Sallusto et al. 1999 Klebanoff et al 2006 Fallen et al. 2003 Hamann et al. 1997
central memory T-Zellen Effektor memory T-Zellen	T cm T em	CCR7+,CD45RO+,CD3+ CCR7-,CD45RO+,CD27+,CD3+	Gedächtniszellen, Langzeitimmunisierung	
Effektor-T-Zellen	T eff	CCR7-, CD45RO+, CD27-,CD3+	Zytotoxine, Perforine, Granozyme und Granulysine sezernierende T-Zellen	
Nicht-naive T-Zellen	T non-naive	CD45RO+,CD3+	Gedächtnis+/Effektor- T-Zellen	
Aktivierung & Proliferation				
Transferrin-Rezeptor+ T-Zellen	CD71+ T-Zellen	CD71+, CD3+	Früher Proliferationsmarker	Rudd et. al 2009 Starska et al. 2011 Myers et al 2005 Ma et al. 2009
Typ II C-Typ Lectin+ T-Zellen	CD69+ T-Zellen	CD69+, CD3+		
CD80/86-R+ T-Zellen	CD28+ T-Zellen	CD28+, CD3+		
TNF-Rezeptor superfamily member 9+ T-Zellen	CD137+ T-Zellen	CD137+, CD3+	APC- T-Zellen -Interaktion	
CD40Ligand+ T-Zellen	CD154+ T cells	CD154+, CD3+		
β-Integrine				
β1-Integrin+ T-Zellen	CD29+ T-Zellen	CD29+,CD3+	Adhäsionsmoleküle	Gorfu et al. 2009 Kamiguchi et al. 1999 deNucci et al. 2011
β7-Integrin+ T-Zellen	β7+ T-Zellen	β7+,CD3+		

Tabelle 5 Übersicht über die T-Zell-Differenzierungsstadien, sowie deren Oberflächenmarkerprofil (DeNucci and Shimizu, 2011; Fallen et al., 2003; Gorfu, Rivera-Nieves, and Ley, 2009; Hamann et al., 1994; Kamiguchi et al., 1999; Klebanoff, Gattinoni, and Restifo, 2006; Ma and Clark, 2009; Myers and Vella, 2005; Rudd, Taylor, and Schneider, 2009; Sallusto et al., 1999; Starska et al., 2011)

3. Material & Methoden

Ein Teil der experimentellen Arbeiten wurde in Kooperation mit cand. Dr. med. Julia Schick (Labor Prof. Schmetzer, Medizinische Klinik III; Klinikum Großhadern) sowie Frau T. Kroell (MTA im Labor Prof. Schmetzer, Medizinische Klinik III, Klinikum Großhadern) angefertigt.

3.1 Patientenkollektiv

Für diese Doktorarbeit wurden 12 periphere Blut- oder Knochenmarksproben von AML Patienten im akuten Stadium der Krankheit bzw. in VR verwendet, die sich im Zeitraum von 2003 bis 2010 in der KMT-Station des Klinikums Großhaderns, im Klinikum Oldenburg oder Harlachinger Klinikum in Behandlung befanden. Die Diagnostik (Zytomorphologie, Zytogenetik, Immunzytologie) wurde von den jeweiligen Kliniken und Laboratorien durchgeführt und uns zusammen mit den klinischen Verläufen zur Verfügung gestellt. Für die ‘DC’-Generierung wurden 6 Proben von Patienten vor SZT (4 bei Erstdiagnose, 1 Probe in Persistenz, 1 Probe in Rezidiv) und 6 Proben nach SZT (2 Proben in Persistenz, 4 Proben in Rezidiv) verwendet. T-Zellen wurden vor SZT, alle in aktiven Stadium der Erkrankung (,autolog‘ n=6) oder nach SZT (n=6) präpariert, von denen 3 in VR und 3 in Rezidiv waren. Die Diagnosestellung der AML- Proben erfolgte nach der FAB-Klassifikation. 2 Patienten hatten eine AML mit minimaler Differenzierung (M0: n=2), 2 Patienten eine AML ohne Ausreifung (M1: n=2) 1 Patient eine AML mit Ausreifung (M2: n=1), 4 Patienten mit einer Akuten myelomonozytäre Leukämie (M4: n=4), 1 Patient eine akute Monoblasten/ Monozyten -Leukämie (M5: n=1), sowie jeweils ein Patient mit einer sAML und CMML/MDS. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 52,1 Jahre, bei einer Spanne von 26-70 Jahren, das Verhältnis männliche zu weibliche Patienten war 1:1. Für die gesunde Vergleichsgruppe wurden periphere Blutproben von 5 gesunden Spendern, mit einem Durchschnittsalter von 28,6 Jahren (Spanne von 26-48 Jahren) verwendet. Das Verhältnis männliche zu weiblichen Probanden war dabei 2:3.

Patientencharakteristik zum Zeitpunkt der 'DC'-Generation							Patientencharakteristik zum Zeitpunkt der T-Zell Präparation
Patienten No.	Alter bei Diagnosestellung	Geschlecht	FAB-Typ	Stadium	Blasten Phänotyp (CD)	IC Bla%	T-Zell-Quelle und Zustand
887	59	w	MDS/CMML	pers Rez.	33,34,14,64,117	8	Pers, autologous*
914	66	m	sAML	n.SZT	34,33,15,117	47	Rez., autolog
824	70	m	M1/M2	Dgn.	7,13,34,117	68	Dgn, autolog
748	67	m	M2	Dgn.	34,33,117,13	50	Dgn, autolog
855	68	m	M4	Dgn.	13,33,34,65,117	37	Dgn, autolog
948	42	w	M5	Dgn.	34,33,117	70	Dgn, autolog
m569	49	w	M0	Pers Rez. n.	15,33,13,34,19	11	VR, nach SZT
853	34	m	M0	SZT	34,33,117	50	VR, nach SZT
m761	38	w	M1	pers Rez. n.	34,117,15,65,2,7	40	VR, nach SZT
880	26	m	M4	SZT Rez. n.	33,64,13,15,117	90	Rez. n. SZT *
458	47	w	M4	SZT Rez. n.	13,33,117	15	VR, nach SZT
938	58	w	M4	SZT	34,117,33,4	74	Rez. n. SZT *

Tabelle 6 Übersicht über die Patientencharakteristik am Zeitpunkt der 'DC'-Generation bzw. T-Zell Präparation. Dgn. = Erstdiagnose; Rez. = Rezidiv; Rez. n. SZT = Rezidiv nach SZT; Pers. = Persistenz; pers. Rez. = persistierendes Rezidiv; VR= Vollremission * T-Zellen geerntet an verschiedenen Zeitpunkten des Rezidivs Pat 880,938 oder während persistierender Erkrankung (Pat. 887) und gepoolt für MLR.

3.2 Verarbeitung des Zellmaterials

3.2.1 Blutentnahme

Nach Einwilligung der Patienten wurde den Patienten das Knochenmark-Aspirat aus dem hinteren Beckenkamm bzw. die Blutprobe aus einer peripheren Vene entnommen. Um eine Gerinnung zu vermeiden wurden pro 50 ml Probenmaterial 5000 I.E. Heparin zugesetzt. Innerhalb von 24h wurde aus der Probe die Mononukleare Zell Fraktion (MNC) isoliert.

3.2.2 Isolierung der MNC-Fraktion

Auf 15 ml der auf Raumtemperatur erwärmten Ficoll-Trennlösung (Ficoll-Hypaque, Biochrom, Berlin, Germany) wurden ca. 30 ml der Blutprobe (peripher venöses Blut oder Knochenmarksaspirat) geschichtet. Die entstandene biphasische Lösung wurde danach bei 460g für 20 min zentrifugiert. Die sich zwischen Serum und Ficoll-Lösung abzeichnende MNC Fraktion wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt, in PBS (Biochrom, Berlin, Germany) resuspendiert und bei 420 g für 7 min zentrifugiert und zur Bestimmung der Zellzahl abermals in PBS resuspendiert. (Böyum 1984). Die MNC-Fraktion der 12 AML-Patienten setzte sich aus durchschnittlich $3\pm 2\%$ B-Zellen, $9\pm 6\%$ T-Zellen, $2\pm 2\%$ NK-Zellen, $5\pm 6\%$ Monozyten sowie $56\pm 25\%$ leukämischen Blasten zusammen. Im Falle einer aberranten Expression von CD19+, CD56+ oder CD14+ durch die Blasten, konnte die Fraktion der B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten nicht quantifiziert werden.

3.2.3 Bestimmung der Zellzahl

25 µl Zellsuspension wurden mit 75 µl Türks-Lösung vermengt und mikroskopisch in 100-facher Vergrößerung mit Hilfe einer Neubauer-Zellkammer gezählt.

3.2.4 Positive Isolierung von CD3+Zellen

T-Zellen wurden mit Hilfe von beads-konjugierten CD3-Antikörpern selektiert. Dafür wurden 10^7 MNC in 80µl MACS-Puffer [473 ml PBS (phosphate buffered saline) + 25 ml BSA (Bovine Serum Albumin) + 2 ml EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)] sowie 20µl CD3⁺ Beads (Miltenyi Biotec) in Lösung gebracht und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Daraufhin wurden der Zellsuspension weitere 500 µl MACS-Puffer zugegeben, 7 min bei 420 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das zentrifugierte Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert bevor dieses auf die im Magneten steckende LS+ Trennsäule (Miltenyi Biotec), welche mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült wurde, gegeben wurde. Dadurch wurden die

magnetisch beladenen T-Zellen an den Magnete gebunden und die verbliebenen CD3-negativen Zellen wanderten in ein Auffangröhrchen unter der Säule. Zuletzt wurde die LS+ Säule aus dem Magneten entfernt, 5 ml MACS-Pufferlösung hinzugefügt und die Suspension mittels eines Stöpsels durch die LS+ Säule gedrückt, um die T-Zellen zu erhalten.

3.2.5 Einfrieren der Zellen

Bis zu $1,5 \times 10^7$ gewaschene Zellen wurden in 500µl fetales Kälberserum (FCS) aufgenommen, mit 500µl auf Eis gekühltem Einfriermedium, bestehend aus 80% FCS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO), in einem Kryoröhrchen vermischt und in einer Einfrierbox bei -80°C eingefroren.

3.3 Generierung von DC leukämischer Abstammung ('DC')

Wie bereits beschrieben, können leukämische Zellen in 'DC' konvertiert werden. Diese Zellen präsentieren sowohl das leukämische Antigenrepertoire, als auch die DC-typischen, für eine suffiziente T-Zell-Aktivierung benötigten, Oberflächenmarker (z.B. CD40, CD86, CD80, CD1a, CD83). Für die Generierung der 'DC' wurden 4 parallel laufende Vorversuche ('MCM-Mimic', 'Ca-Ionophore', 'Picibanil', 'Intron') durchgeführt, um die effektivste Methode für den Hauptversuch zu ermitteln. Verwendet wurden dazu 12-Wellplatten mit FCS-freiem Medium (Xvivo 15 Bio Whittaker, Europe, Verviers, Belgien), welche samt Zellen bei 37°C und 5% CO_2 für 4-11 Tage im Brutschrank inkubiert wurden.

'MCM-Mimic'

Zu $2,5 \times 10^6$ MNC/ml gaben wir ein Zytokingemisch, bestehend aus 800 U/ml GM-CSF (Sandoz), 500 U/ml IL-4 (Cell concepts, Umkirch, Deutschland) und 40 ng/ml FLT-3 (PromoCell). Die Zugabe der gleichen Menge erfolgte erneut an den Tagen 4 oder 5 sowie Tag 7 oder 8, wobei zum letzten Zeitpunkt ein halber Mediumwechsel sowie die zusätzliche Zugabe von 150ng/ml IL-6 (Cell concepts), 10 ng/ml IL-1 β (Cell concepts), 1µg/ml Prostaglandin E₂ (PGE₂ Pfizer, Wien, Österreich) und 200 U/ml TNF- α (Cell concepts) durchgeführt wurde. An Tag 10-12 wurden die Zellen geerntet und die Anteile von DC und 'DC' bestimmt (Kremser et al., 2010; Lee et al., 2002; Woiciechowsky et al., 2001)

‘Ca-Ionophore (A 23187)‘

0,7 x 10⁶ MNC/ml Zellen wurden mit 375 ng/ml A23187 (Sigma-Medizin-Technik, Thum, Deutschland) und 250 U/ml IL-4 für 3-4 Tage inkubiert (Houtenbos et al., 2003; Kremser et al., 2010).

‘Picibanil (OK-432)‘

1,25 x 10⁶ MNC/ml wurden mit 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 in Kultur angesetzt und inkubiert. Nach 7-8 Tagen wurden 10 µl OK-432 (Chugai Pharmaceuticals, Kamakura City, Japan) und 1 µg/ml PGE₂ hinzugefügt ehe an Tag 9-11 die Ernte und durchflusszytometrische Messung der Zellen erfolgte. Bei der Generierung von DC aus MNC bei Proben von gesunden Spendern erfolgte die Zugabe der Zytokine OK-432 und PGE₂ bereits an Tag 4-5, die durchflusszytometrische Messung an Tag 7-8 (Kremser et al., 2010; Sato et al., 2003).

‘Intron‘

2,5 x 10⁶ MNC/ml wurden mit 800 U/ml GM-CSF und 5 µ/ml Intron versetzt und inkubiert. Nach 3-4 Tagen erfolgte eine erneute Zugabe von GM-CSF und Intron in gleicher Menge, an Tag 7-8 ein halber Mediumwechsel sowie die erneute Zugabe von GM-CSF, Intron und 200 U/ml TNF-α. Nach 10-12 Tagen wurden die Zellen geerntet. Bei Proben von gesunden Spendern erfolgte die Zugabe von GM-CSF, ‘Intron‘ und TNF-α nur einmalig, der Mediumwechsel entfiel, die Zellen wurden ebenfalls an Tag 10-12 geerntet (Kremser et al., 2010).

Alle für die DC-Generierung verwendeten Reagenzien sind für die Behandlung von Patienten zugelassen. Generell sollte im Hinblick auf einen späteren klinischen Einsatz von generierten DC darauf geachtet werden Serum-freie Medien zu verwenden (Houtenbos et al., 2003).

3.4 Quantifizierung und Charakterisierung von ‘DC’

Die Quantifizierung und Charakterisierung der ‘DC’ ist wichtig, um den Erfolg der ‘DC’-Generierung zu kontrollieren. Nur so kann eine erfolgreiche T-Zell-Stimulation gewährleistet werden. Frühere Methoden der DC Erkennung mittels Morphologie unter dem Mikroskop

sind unbefriedigend, da es nicht immer gelingt, DC von anderen Zellen aufgrund des sich ähnelnden Phänotyps zu unterscheiden.

Unsere Arbeitsgruppe entwickelte eine eigene durchflusszytometrische Strategie zur Quantifizierung und Charakterisierung von 'DC' (Schmetzer et al., 2007). Diese Strategie nutzt die Tatsache, dass DC und Blasten unterschiedliche Side Scatter Profile und Antigenexpressionsprofile aufweisen. So ist es möglich, 'DC', Blasten, die nicht zu 'DC' konvertierten, und DC nichtleukämischer Abstammung zu unterscheiden. Leukämische Blasten können durch Blasten-typische Marker wie CD33, CD34, CD117, CD65, CD56, CD7, DC durch Oberflächenmarker wie CD80, CD86, CD40, CD1a, CD83, CD206, CD1b, CD137L charakterisiert werden. Allerdings können DC-typische Antigene wie z.B. CD80, CD86 oder CD83 auch auf Blasten exprimiert sein. Aus diesem Grund werden vor 'DC'-Generierung ein oder wenn möglich mehrere DC Marker ermittelt, welche nicht auf den Blasten exprimiert werden. Zusätzlich werden exprimierte Blastenmarker ermittelt. Nach 'DC'-Generierung wird nun untersucht, ob doppelt-positive Zellen für die zuvor ermittelten negativen DC-Marker und positiven Blastenmarker entstanden sind (Schmetzer et al., 2007). Diese doppelt positiven Zellen entsprechen den aus Blasten entstandenen 'DC', welche somit sowohl das Blastenantigen als auch die spezifischen Co-stimulatorischen Antigene der APC exprimieren. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung dieses Vorgangs.

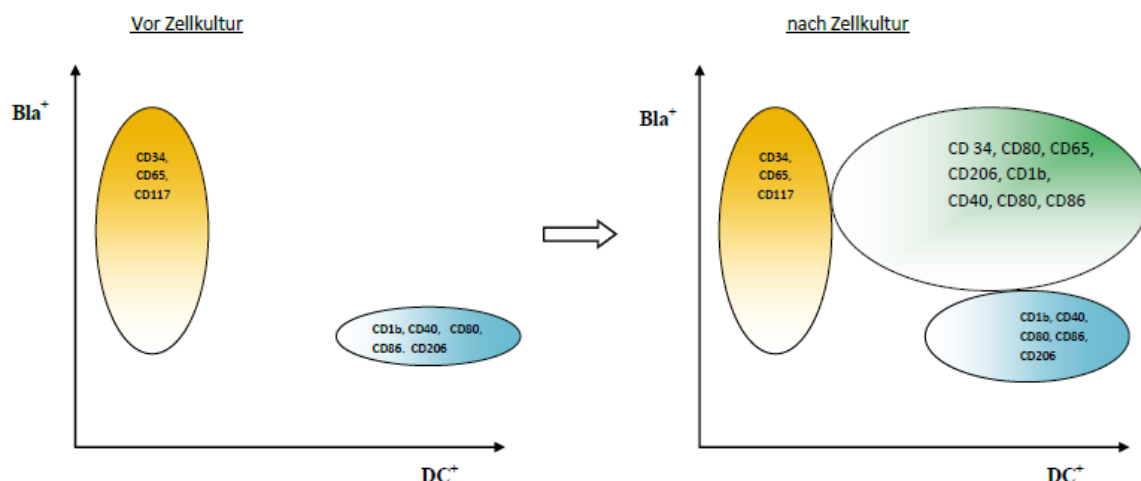


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Umwandlung von Blasten zu 'DC'. Links im Bild: Blasten (Bla^+/DC^- -gelb) und DC (Bla^-/DC^+ -blau) mit exemplarischen Oberflächenmarkern vor Zellkultur. Rechts im Bild: Nach Zellkultur lassen sich 'DC' (Bla^+/DC^+ -grün) mit positiver Expression von Blastenantigenen und DC-Oberflächenmarkern nachweisen

Da sich Blasten und DC bezüglich ihrer Fluoreszenz unterscheiden, ist es nicht möglich beide Zelltypen nur mit einem Gate zu analysieren. Deshalb entwickelten wir eine 2-Gate-Strategie. Das erste Gate, das sogenannte Blastengate, wird um die Blastenpopulation gelegt, die durch einen niedrigen SSC (Side Scatter) und FSC (Forward Scatter) charakterisiert ist. Das zweite Gate, das sogenannte DC-Gate, umfasst die restlichen Zellen. Beide Gates haben die für sie enthaltenen Zellen die optimalen Instrumenten-Einstellungen, so dass unabhängig voneinander in jedem Gate positive und negative Ereignisse bestimmt und quantifiziert werden können. Am Ende werden dann die Ergebnisse der beiden Gates summiert (Schmetzer et al., 2007).

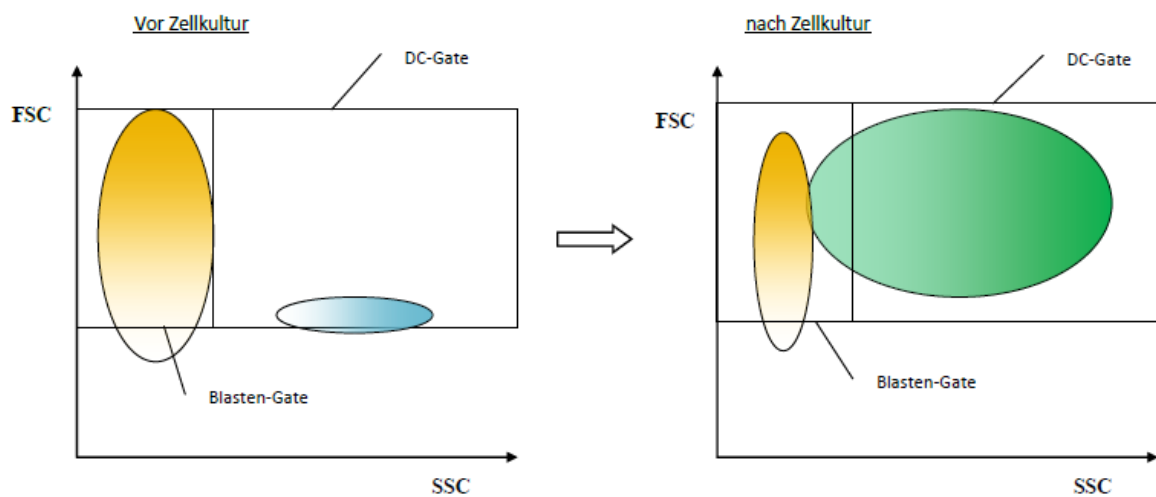


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Gatingstrategie zur Quantifizierung der ‚DC‘. Links im Bild: vor der Zellkultur befinden sich die Blasten (**orange**) in einem umschriebenen Blasten-Gate und wenige DC (**blau**). Nach Zellkultur beobachtet man eine „Wanderung“ der Zellen im SSC, was durch das nun vermehrte Vorkommen von ‚DC‘ (**grün**) zu erklären ist.

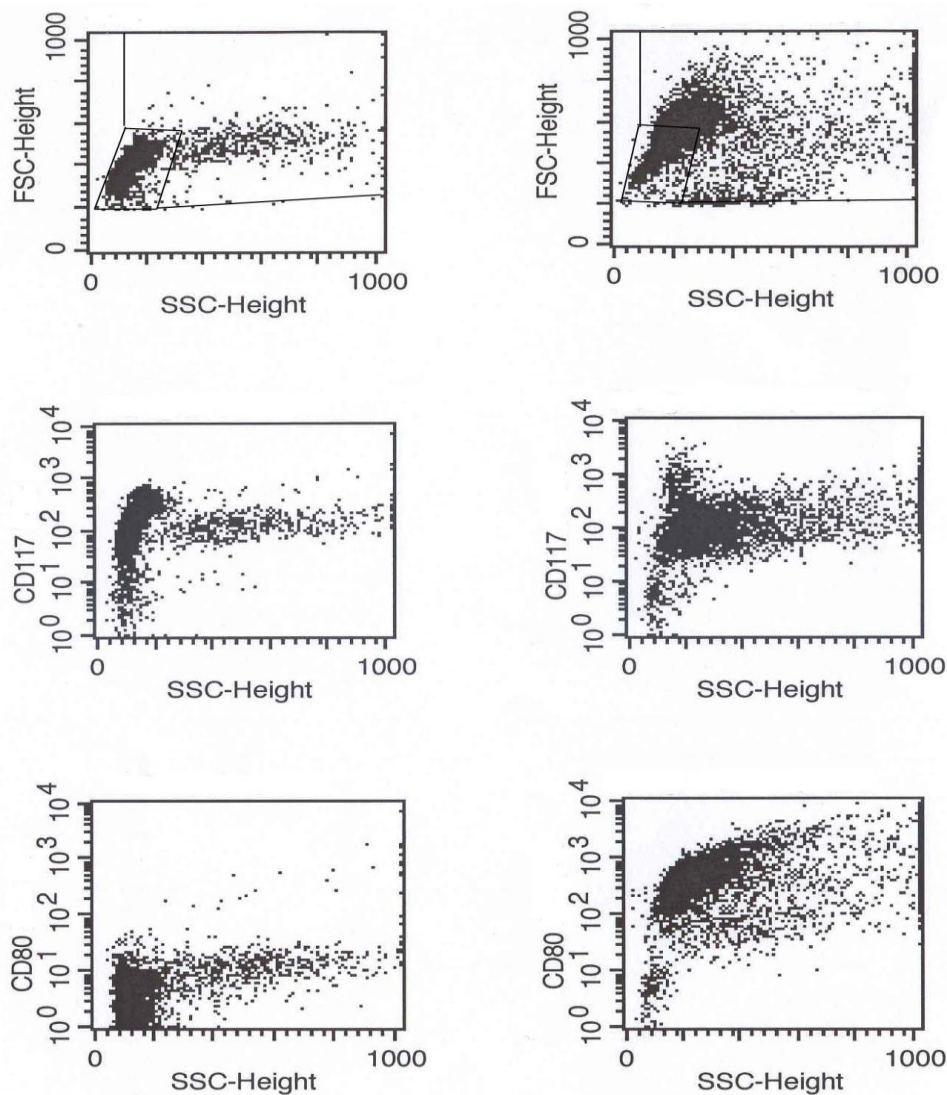


Abbildung 5 Beispiel einer ‚DC‘-Quantifizierung. Vor der Zellkultur lassen sich die typischen Blasten- und DC-Gates festlegen (links oben). Nach Zellkultur „wandern“ die Zellen entlang des FSC und SSC (rechts oben). Darunter zeigt sich das Verhalten der CD117⁺ (Blasten) bzw. CD80⁺ DC im SSC-Profil. Jeweils links in der Abbildung vor Zellkultur und rechts nach Zellkultur. Es zeigt sich eine erhöhte Ablenkung der Strahlen im SSC nach Zellkultur. (Abb. wurde mir freundlicherweise von Prof. Schmetzer zur Verfügung gestellt.)

Tote Zellen und Zellschutt wurden beim ‚Gating‘ abgeschnitten und von der Analyse ausgeschlossen.

Die Generierung von ‚DC‘ wurde als positiv erachtet wenn >10% DC und gleichzeitig >5% ‚DC‘ innerhalb der Zellfraktion gefunden wurden.

3.5 Ergebnis der ‚DC‘-Generierung

Es konnten mittels etablierter Methoden in jeder Probe der 17 Fälle (AML-Patienten und gesunde Probanden) erfolgreich DC generiert werden. In 7 von 12 Fällen war ‚MCM-Mimic‘, in 3 von 12 Fällen Ca-Ionophore und in 2 von 12 Fällen ‚Picibanil‘ die beste Methode zur ‚DC‘-Generierung. Die Proben der AML-Patienten zeigten nach der Inkubation in dem

individuell am besten geeigneten Medium durchschnittlich $23 \pm 16\%$ DC (10-56%) und $9 \pm 7\%$ 'DC' (5-19%)

3.6 Gemischte Lymphozytenkultur (MLR)

Isolierte $CD3^+$ T-Zellen der AML Patienten oder der gesunden Spender wurden parallel mit bestrahlten (20 Gy für 1h) 'DC' bzw. blastenhaltigen MNC in einer 24 Wellschale angesetzt. Pro $1,5 \times 10^6$ T-Zellen wurden 37.000 'DC' bzw. MNC in 1,5 ml RPMI-1640 Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 15% Humanserum (PAA, Laboratories, Pasching, Österreich) und 50 U/ml IL-2 (Proleukin R5, Chiron, München, Deutschland) angesetzt. Die Zellen wurden an den Tagen d0, d1, d3, d5 und d7 geerntet und ihr Antigenprofil gemessen; an d7 wurde darüber hinaus ein Blastenlysetest durchgeführt. An den Tagen d3 und d5 erfolgten ein halber Mediumwechsel, sowie die Restimulation mit 37.000 bestrahlten 'DC' bzw. MNC und 50 U/ml IL-2 (Kremser et al., 2010).

3.7 Durchflusszytometrie

Unter Berücksichtigung des jeweiligen individuellen Blastenphänotyps wurde eine Basis-FACS-Flow Analyse zur Bestimmung des Phänotyps und der Menge der leukämischen Blasten, T-Zellen, Monozyten und DC durchgeführt. Dies erfolgte durch Fluorescein Isothiocyanate (FITC), Phycoerythrin (PE), Tandem Cy7-PE (PC7) und Allophycocyanin (APC), welche direkt an monoklonale Maus-Antikörper (moAbs) gekoppelt sind. Um Unterschiede in der Antigenbestimmung zu vermeiden wurde in jeder Messung das gleiche Panel und identische Antikörper Kombinationen verwendet; Antigene mit bekanntermaßen eher schwacher Expression wurden mit Antikörpern mit starken Farbstoffen wie APC und PE gemessen, Antigene mit starker Expression auf der Zelloberfläche mit Antikörpern mit schwächeren Farbstoffen wie FITC und Cy7.

Die Antikörper wurden zur Verfügung gestellt von Immunotech/Beckman Coulter ^a (Krefeld, Deutschland) Becton Dickinson ^b (Heidelberg, Deutschland), Caltag ^c (Hamburg, Deutschland), Serotech ^d (Düsseldorf, Deutschland), und Invitrogen ^e (Karlsruhe, Deutschland).

Folgende moAbs wurden verwendet:

FITC konjugierte moAbs : $CD1b^b$, $CD80^{ab}$, $CD83^a$, $CD86^c$, $CD3^a$, $CD27^d$, $CD154^b$,
 $CD45RO^a$.

PE-konjugierte moABS: $CD80^a$, $CD83^a$, $CD86^{bc}$, $CD206^a$, $CD4^a$, $CD8^b$, $CD137^c$, $CD29^c$.

PC7-konjugierte moABs: CD1a^a, CD40^c, CD3^a, CD4^a, CCR7^b, 7AAD

PC-konjugierte moAbs CD34^{a,c}; CD117^a, CD33^a, CD1a^a, CD40^c, CD206^a CD3^a, CD8^b, CD28^b, CD45RO^c, CD69^b, CD71^b, β 7-Integrin^b

Zu messende Zellen wurden gewaschen (370g, 7 min) in PBS und 20 % FCS (Biochrom) resuspendiert und unter Berücksichtigung der Herstellerhinweise mit den moAbs inkubiert. Im Durchschnitt wurden pro Röhrchen 50.000-100.000 Zellen inkubiert, wobei letztendlich 3000-5000 Ereignisse am FACS Calibur Flow-Zytometer (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland) gemessen und mit der Cell-Quest Software für Analysen (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Deutschland) evaluiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper herauszufiltern, wurden stets mit Isotypkontrollen durchgeführt.

3.7.1 T-Zell Gating

Um eine möglichst unverfälschte Messung von aktivierten T-Zellen nach MLR zu erhalten wurde beim Gating darauf geachtet, möglichst alle CD3+ Zellen zu erfassen. Hierzu wurde ein Gate möglichst eng um das Lymphozyten-Cluster gelegt, welches nach oben eine offene Konfiguration besitzt, wie in der Literatur beschrieben wurden (Molero et al., 2005). Dabei wurde berücksichtigt, dass das T-Zell Cluster unter Stimulation seine Lage ändert, so dass alle T-Zellen erfasst werden.

Leukämische Zellen wurden als positiv für einen Marker gewertet, wenn 20% der Blasten in der MNC-Fraktion positiv für diesen Marker waren (Campana Behm 2000; Bene 1995). T-Zellen wurden über die Expression von CD3 detektiert..

3.8 T-Zell Charakterisierung

Über die Jahre wurden viele verschiedene Panels zur T-Zell Charakterisierung geprüft. Unter diesen fanden die Panels von Sallusto, Berger und Fallen mit am meisten Beachtung (Berger et al., 2008; Fallen et al., 2003; Sallusto, Geginat, and Lanzavecchia, 2004; Sallusto et al., 1999). In einem Vorversuch untersuchten wir verschiedene Panels, um das für unseren Versuch am besten funktionierende Panel zu finden. Da sich die Panels von Sallusto und Fallen weitgehend ähnelten stellten wir diese dem Panel von Berger gegenüber. Tabelle 7 zeigt die verwendeten Panels für diesen Vergleich:

	T _{naive}	T _{cm}	T _{em+eff}
Berger	CD62L ⁺ CD95 ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	CD62L ⁺ CD95 ⁺ CCR7 ⁺ CD28 ⁺	CD62L ⁻ CD95 ⁺ CCR7 ⁻ CD28 ⁻
Sallusto/Fallen	CCR7 ⁺ CD45RO ⁻	CCR7 ⁺ CD45RO ⁺ CD27 ⁺	CCR7 ⁻ CD45RO ⁺

Tabelle 7 Expressionsprofile von T-Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien im Vergleich (,Berger‘ vs ,Sallusto/Fallen‘ - Strategie)(Berger et al., 2008; Fallen et al., 2003)

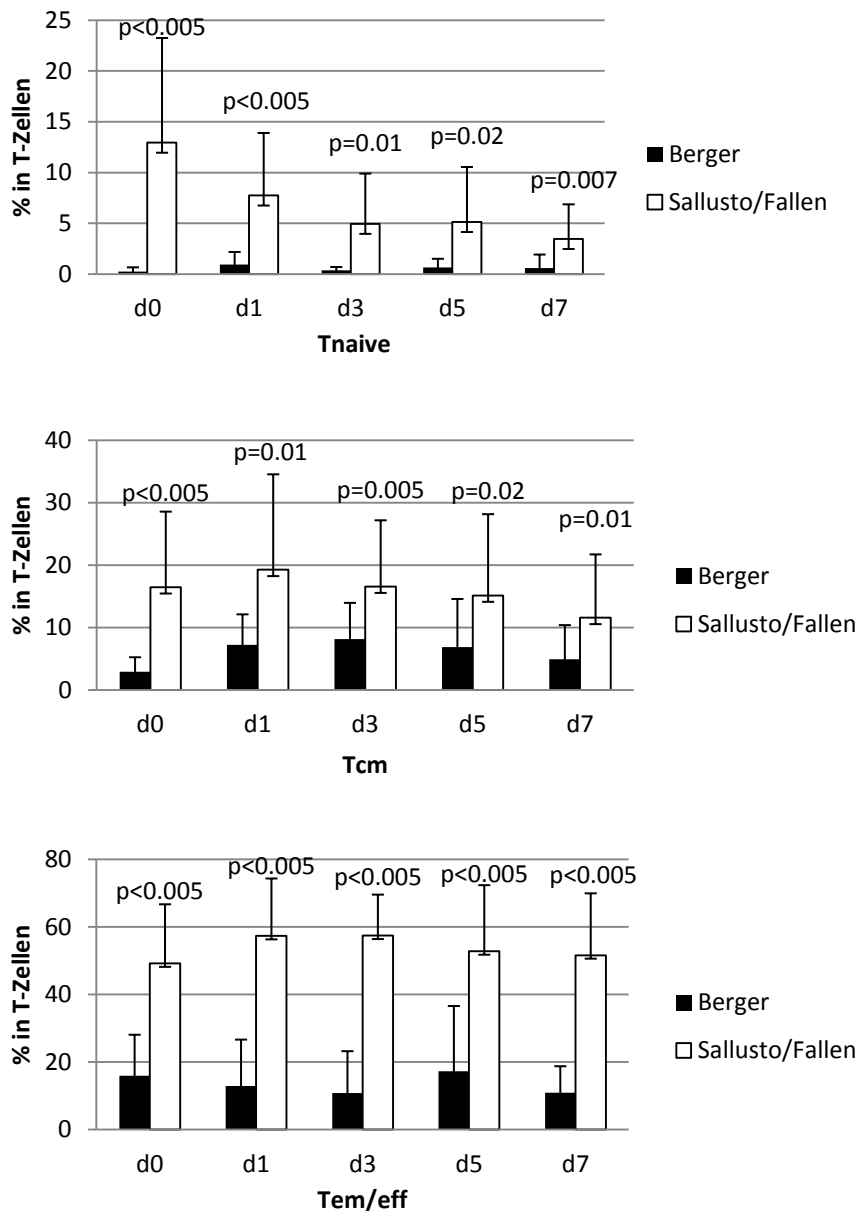


Abbildung 6 Anteile von T-Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien im Vergleich (,Berger‘ vs ,Sallusto/Fallen‘ - Strategie)(Berger et al., 2008; Fallen et al., 2003). Es zeigt sich, dass an Hand des Berger-Panels durchgehend weniger positive T-Zellsuptypen gemessen werden konnten.

Es fiel auf, dass mit Hilfe des Berger Panels durchgehend geringere Anteile an positiven T-Zell Subtypen detektiert werden konnten als mit den Strategien von Sallusto oder Fallen.

Insbesondere T_{naive} sowie T_{em+eff} wurden kaum durch das Panel nach Berger erfasst, so dass wir uns für das Panel von Sallusto/Fallen für die T-Zell Charakterisierung der Subtypen entschieden.

3.9 Blastenlysetest

Die lytische Aktivität der T_{eff} wurde durch einen Lyse-Test gemessen. Bei diesem Test wird die Anzahl der lebenden Blasten mit Hilfe spezieller Antikörpern vor und nach Kontakt mit Effektorzellen (E) bestimmt und die Anteile lebender Blasten durch die Zugabe von ‚Beads‘ in Abhängigkeit der ursprünglichen Anteile lebender Zellen ermittelt. ‘DC‘- oder Blasten stimulierte T-Effektorzellen (E) der AML-Patienten wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit den Blasten-haltigen ‘MNC‘ der AML-Patienten als Zielzellen (T) in einem Verhältnis von 1:1 für 3h sowie über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Vorhinein wurden die Blasten für 15 Minuten mit 2 blastenspezifischen Antikörpern in FITC oder PE markiert, ehe sie mit den Effektorzellen zusammengeführt wurden. Als Kontrolle wurden Effektorzellen separat nach gleichem Schema behandelt und erst kurz vor der Messung mit den Targetzellen vermischt. Um die Anzahl der lebendigen Zielzellen und den Zellverlust nach 24h Inkubation zu bestimmen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und resuspendiert, mit 7AAD (BD, Biosciences Pharmingen) versetzt und eine definierte Menge an Fluorosphere beads (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) hinzugefügt. Die lebenden Zellen wurden in einem SSC/7AAD-gate gegatet und im Anschluss die Anteile lebender Zellen, die spezifische Blastenmarker exprimierten, mit Hilfe der definierten Menge hinzugefügter Beads quantifiziert. Die Zellen wurden in einem FACS Calibur Flow Cytometer analysiert und mit der CELL Quest software (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) ausgewertet. Der Prozentsatz der Lyse wurde als die Differenz der Zielzellen vor und nach Effektorzell-Kontakt festgelegt (Kienzle et al., 2002;Kufner et al., 2005a).

3.10 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Mittelwerte, Standardabweichung und die Ergebnisse des two-tailed-T-Tests wurden an einem PC mittels Excel 2007 (Microsoft) berechnet. Das statistische Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

Wir verglichen T-Zell Profile vor und nach Stimulation mit blastenhaltigen MNC ('MNC') bzw. mit 'DC' von gesunden Probanden mit Profilen von T-Zellen von AML-Patienten bei Erstdiagnose, während persistierender Krankheit und mit Rückfall vor SZT sowie von AML Patienten nach allogener SZT. Da T-Zell Profile der AML Patienten vor und nach SZT vergleichbar waren, wurden die Ergebnisse dieser beiden Gruppen für den Vergleich mit gesunden T-Zellen gepoolt.

4.1 Vor Stimulation

4.1.1 AML Patienten zeigen höhere Anteile an T_{naive} und T_{eff} und geringere Anteile an T_{cm} vor Stimulation im Vergleich zu gesunden Spendern.

Unsere Analysen vor Stimulation zeigten, dass sich das T-Zell Expressionsmuster von AML-Patienten von gesunden Probanden unterscheidet. AML-Proben hatten signifikant höhere Anteile an T_{naive} ($p=0.04$) und T_{eff} ($p=0.02$) sowie geringere Anteile an T_{cm} ($p=0.08$) in $CD4^+$ T-Zellen als die gesunden Probanden ($14\pm12\%$ $CD4^+ T_{naive}$, $21\pm16\%$ $CD4^+ T_{cm}$, $18\pm16\%$ $CD4^+ T_{eff}$ in AML vs $5\pm5\%$ $CD4^+ T_{naive}$, $37\pm15\%$ $CD4^+ T_{cm}$, $6\pm3\%$ $CD4^+ T_{eff}$ in gesunden Probanden (siehe Abb.7). Für T_{cm} und $T_{non-naive}$ ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede. Im Allgemeinen konnten wir in $CD8^+$ T-Zellen eine ähnliche Verteilung beobachten mit ebenso signifikant höheren Werten für T_{eff} ($p=0.006$) und niedrigen Werten für T_{cm} bei den AML-Patienten, mit dem Unterschied, dass $CD8^+$ T-Zellen gesunder Probanden einen höheren Anteil an T_{naive} aufwiesen (siehe Abb.7)

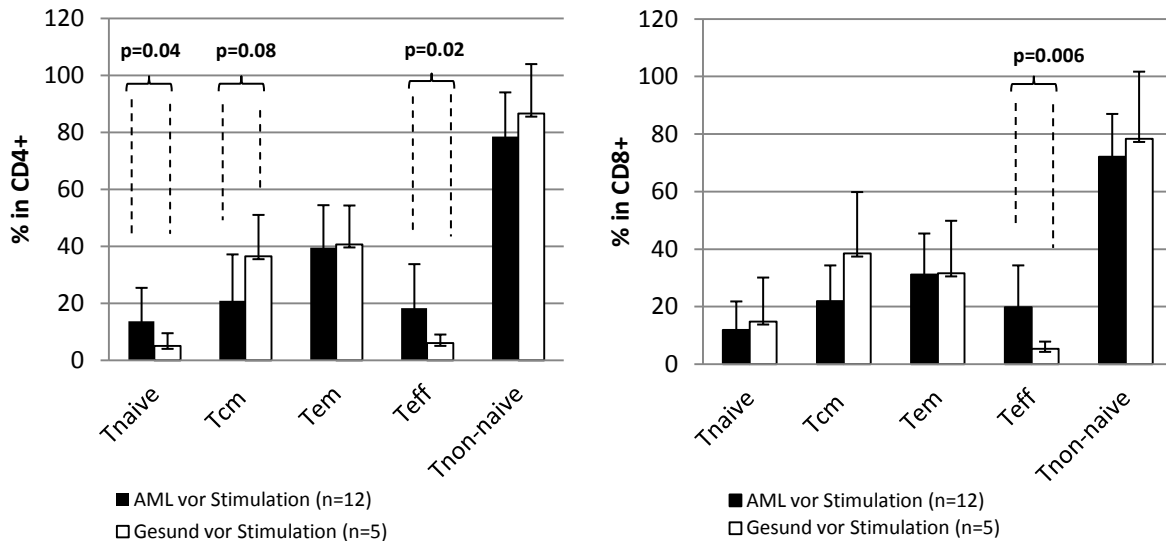


Abbildung 7 zeigt die Anteile der verschiedenen Differenzierungsstadien in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Der Vergleich zwischen Proben von gesunden Probanden und AML-Patienten zeigte, dass AML-Patienten höhere Anteile an T_{naive} und T_{eff} hatten, wohingegen Gesunde höhere Werte für T_{cm} aufwiesen.

4.1.2 T-Zellen von gesunden Probanden zeigen einen höheren Grad der Aktivierung vor Stimulation als T-Zellen von AML-Patienten

Unstimulierte T-Zellen von gesunden Probanden zeigten geringe Anteile an CD69⁺CD3⁺ (2±2%) und CD71⁺CD3⁺ (9±8%) Zellen und höhere Anteile von CD28⁺CD3⁺ (80±13%) und CD137⁺CD3⁺ (28±20 %) Zellen. Überraschenderweise zeigten sich überdies nur geringe Anteile von CD154⁺CD3⁺ Zellen (2±2%). Im Vergleich zwischen AML-Patienten und gesunden Probanden, ließ sich im Allgemeinen festhalten, dass gesunde Probanden höhere Anteile an aktivierten T-Zellen als AML-Patienten aufwiesen. Am deutlichsten zeigte sich dies für CD28, welcher von durchschnittlich 96±2% der T-Zellen aus gesunden Probanden exprimiert wurde im Gegensatz zu 80±13% auf AML-T-Zellen (p=0.002). Analoges konnten wir für CD137 (p=0.01) feststellen (Abb.8).

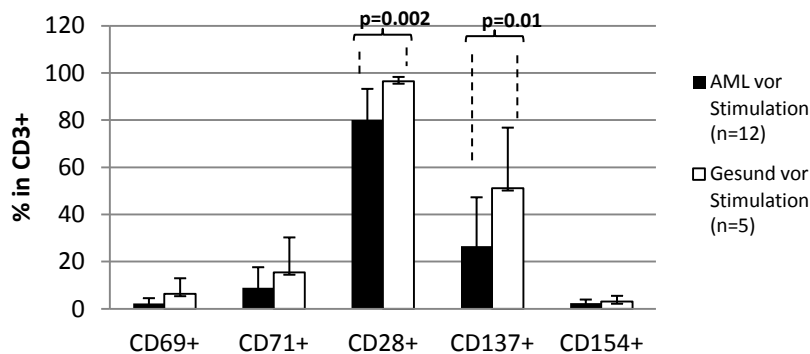


Abbildung 8 Vergleich der Aktivierungsmarker CD69, CD71, CD28, CD137 und CD154 vor T-Zell-Stimulation. Im Allgemeinen wiesen gesunde Spender höhere Anteile an Aktivierungsmarker-positiven T-Zellen aus, was für einen höheren Grad der Aktivierung vor Stimulation spricht.

4.1.3 Gesunde T-Zellen vor Stimulation weisen höhere Anteile an β -Integrin exprimierenden T-Zellen aller Differenzierungsstadien auf

Unsere Analyse konnte zeigen, dass vor Stimulation gesunde Probanden signifikant höhere Anteile von β -Integrin-positiven T-Zellen in allen Differenzierungsstadien der T-Zellen aufwiesen als auf T-Zellen von AML-Patienten. Abbildung 9 zeigt die Expression von β -Integrin⁺ und CD29⁺ T_{naive}, T_{cm} und T_{em+eff}. Für β -Integrin zeigten sich signifikante Unterschiede in T_{naive} (p=0.006), T_{cm} (p=0.05) und T_{em+eff} (p=0.04), wie auch für CD29 in T_{naive} und T_{cm} (p<0.001).

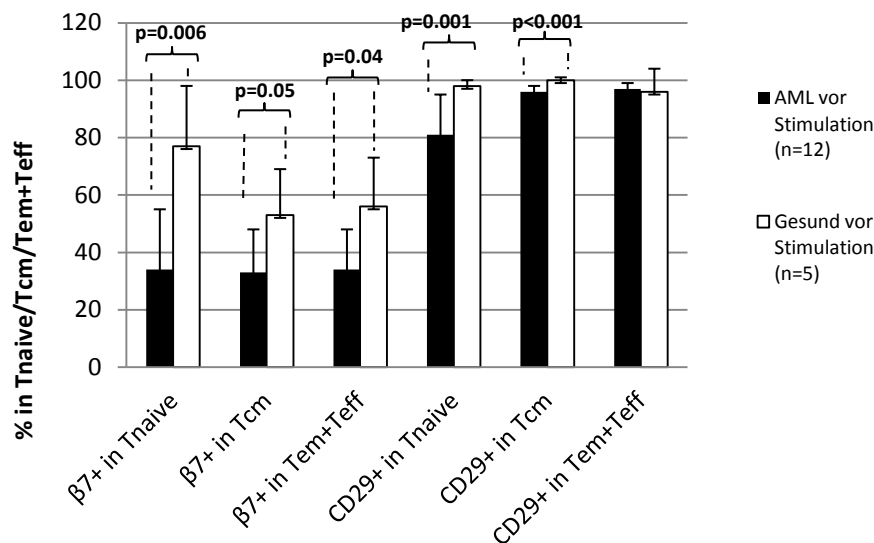


Abbildung 9. Vergleich der Anteile von β 7-Integrin und CD29-positiven T-Zellen in verschiedenen T-Zell-Differenzierungsstadien vor der Stimulation. Gesunde T-Zellen zeigten höhere Anteile von β 7-Integrin und CD29 exprimierenden T-Zellen als die der AML-Patienten.

Insgesamt präsentierten sich T-Zellen von AML-Patienten mit höheren Anteilen von T_{naive} sowie T_{eff} und geringeren Anteilen von T_{cm} in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. T-Zellen von AML-Patienten wiesen im Vergleich zu gesunden Probanden niedrigere Anteile aktivierter T-Zellen sowie β -Integrin-exprimierende T-Zell in allen T-Zell-Differenzierungsstadien auf.

4.2 Nach Stimulation

4.2.1 Die Stimulation von T-Zellen mit 'DC' als auch 'MNC' von AML-sowie gesunden Proben führt zu einer Änderung des T-Zellprofiles

Nach 7 Tagen Stimulation von T-Zellen in MLR konnten wir Änderungen im Expressionsmuster der T-Zellen von AML-Patienten und der gesunden Probanden feststellen. Höhere Anteile an T-Zellen vom Effektorotyp sowie aktivierte T-Zellen waren nachweisbar.

4.2.2 'DC'-Stimulation zeigt keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur 'MNC'-Stimulation von T-Zellen.

Interessanterweise konnten wir kaum Unterschiede der T-Zellprofile nach 'DC'-Stimulation gegenüber der 'MNC'-Stimulation bei AML, bzw. gesunden Proben feststellen. Wenn Unterschiede messbar waren, lagen diese innerhalb weniger Prozentpunkte und wiesen keine Signifikanz auf. Zwischen gesunden und AML-Proben ließen sich einige Unterschiede feststellen, auf die im Folgenden eingegangen werden soll:

4.2.3 AML-Proben zeigen geringere Anteile von T_{cm} und höhere Anteile von T-Zellen mit Effektorfunktion.

Nach 7 Tagen Stimulation wiesen die 'DC'-stimulierten $CD4^+$ Zellen von gesunden Probanden signifikant höhere T_{cm} -Anteile gegenüber denen von AML-Patienten auf ($p=0.05$), wohingegen größere T_{em} - und T_{eff} -Fraktionen in den Patientenproben gemessen werden konnten. Eine ähnliche Verteilung zeigte sich in den $CD8^+$ -T-Zellen ($p=0.03$). Bei den T_{naive} und $T_{non-naive}$ ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Siehe Abb.10). Ähnliches fanden wir in der Analyse der $CD8$ -Population. Auch hier zeigten sich höhere Anteile der T_{em} und T_{eff} in den T-Zellen der AML gegenüber den T-Zellen von Gesunden, mit einem signifikanten Unterschied von $p=0.04$ in T_{eff} im Vergleich zwischen 'DC'-stimulierten AML-T-Zellen und 'DC'-stimulierten gesunden T-Zellen.

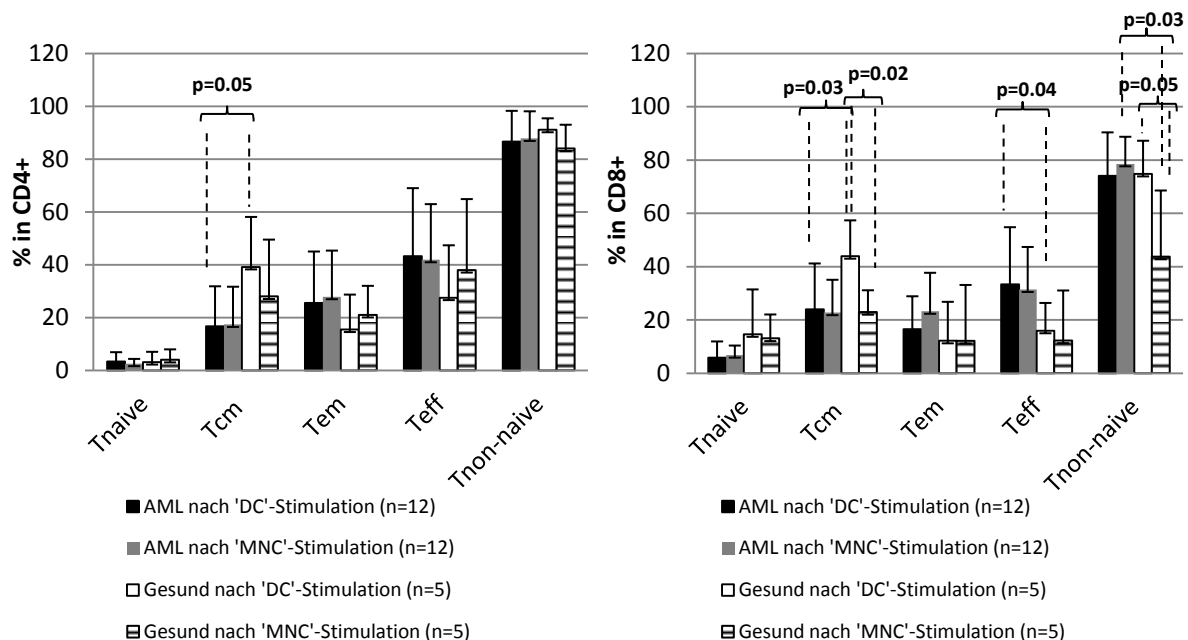


Abbildung 10 Zusammensetzung der $CD4^+$ und $CD8^+$ Subpopulation. Vergleich von AML-Patienten mit gesunden Probanden nach sowohl 'DC'-Stimulation als auch 'MNC'-Stimulation. Gesunde Probanden hatten einen höheren Anteil an T_{cm} wohingegen, AML-Patienten höhere Anteile an T_{em} und T_{eff} aufwiesen.

4.2.4 Sowohl AML- als auch gesunde Proben zeigen eine Hochregulation an aktivierten T-Zellen, allerdings unterschiedlicher Ausprägung

AML-Patienten als auch das gesunde Vergleichskollektiv zeigten im Vergleich zu unstimulierten Zellen einen höheren Anteil an CD69⁺ und CD71⁺ Zellen nach Stimulation. Bei den Markern CD69 und CD71 ließen sich keine Unterschiede zwischen den AML- und gesunden Proben feststellen, jedoch wiesen gesunde T-Zellen nach 'DC'-Stimulation höhere Anteile an CD69⁺ und CD71⁺ T-Zellen im Vergleich zur 'MNC'-Stimulation auf (p=0.07-0.09). Interessanterweise zeigte sich wie schon an Tag 0 ein signifikant höheres Vorkommen von CD28⁺ (p=0.002-0.006) und CD137⁺ (p=0.08) T-Zellen bei gesunden Probanden im Vergleich zu den AML-Patienten. Im Gegensatz dazu zeigten AML-Patienten größere Anteile an CD154⁺ T-Zellen (p=0.03) (siehe Abb.11).

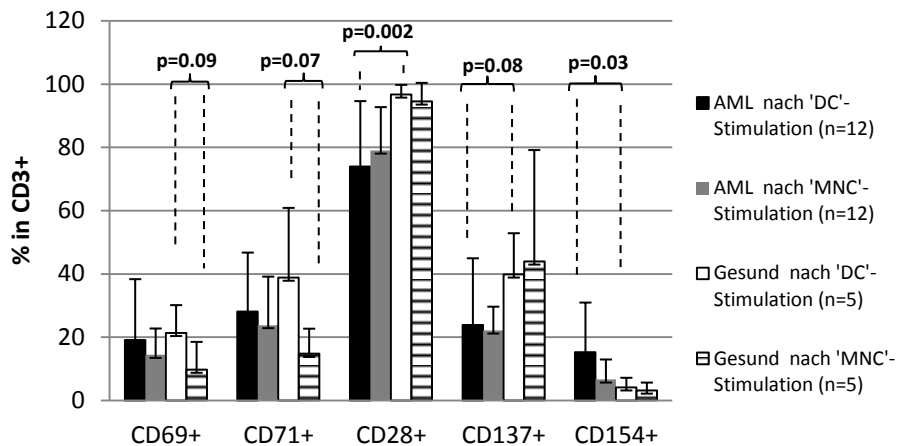


Abbildung 11 Expression der Aktivierungsmarker auf T-Zellen von gesunden Probanden nach 'DC'- und 'MNC'-Stimulation, sowie von AML-Patienten nach 'DC'- und 'MNC'-Stimulation. Nach Stimulation zeigten sich höhere Anteile an CD28⁺ und CD137⁺ T-Zellen in gesunden Probanden, wohingegen in AML-Proben höhere Anteile an CD154⁺ Zellen gemessen werden konnten.

4.2.5 Stimulierte T-Zellen von AML-Patienten zeigen geringere Anteile von β -Integrinen im Vergleich zu gesunden Probanden.

T-Zellen gesunder Probanden präsentierten sich ähnlich dem Tag 0, auch nach Stimulation, mit größeren Anteilen an $\beta 7$ -Integrin⁺ T_{naive} im Vergleich zu AML-Patienten (p=0.02). Der Marker CD29 wurde nahezu auf 100% der stimulierten T-Zellen von gesunden Probanden exprimiert. Im Vergleich zu den AML-Patienten zeigten sich jeweils signifikant höhere Anteile an allen T-Zell-Differenzierungsstadien (T_{naive}, T_{cm}, T_{em+eff}). Innerhalb der AML-Patienten und den gesunden Probanden konnten wir keinen Unterschied zwischen 'DC' und 'MNC'-Stimulation feststellen. (Siehe Abb.12).

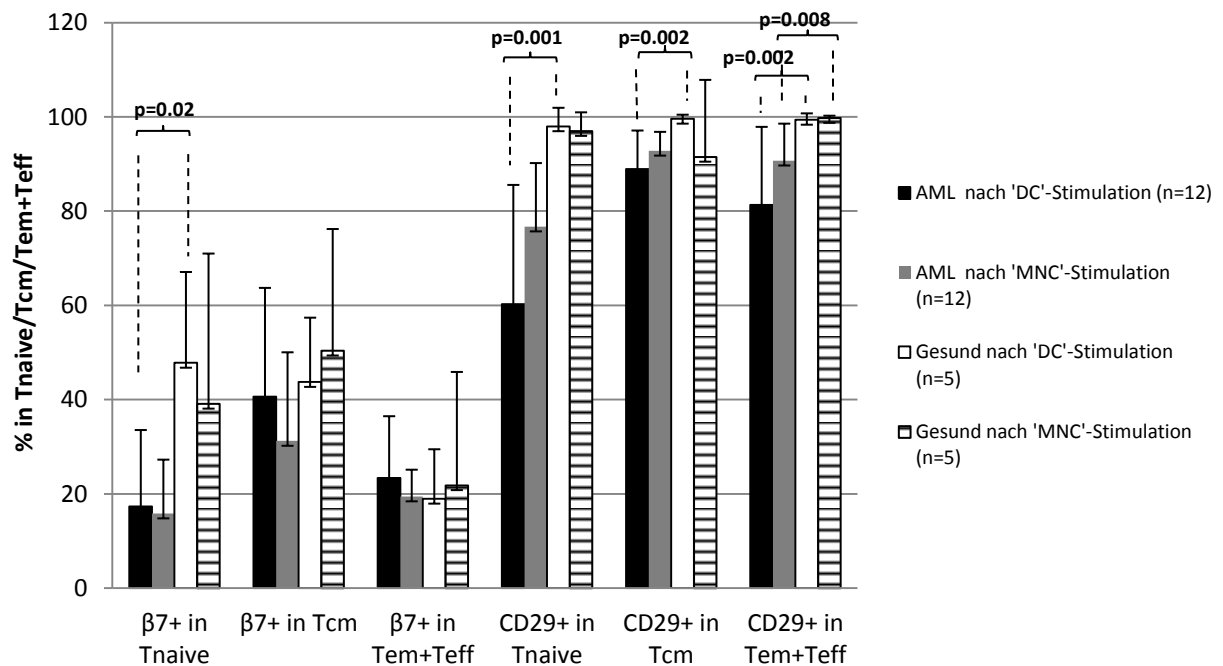


Abbildung 12 Vergleich der Anteile an $\beta 7$ -Integrin⁺ und CD29⁺ T-Zellen innerhalb der T-Zell-Differenzierungsstadien (T_{naive} , T_{cm} , T_{em+eff}) nach T-Zell-Stimulation. Es zeigten sich höhere Anteile von $\beta 7$ -Integrinen auf T_{naive} von Gesunden als auch von AML-Patienten, in T_{cm} und T_{em+eff} zeigte sich ein ausgeglichenes Verhältnis. Dagegen zeigten sich signifikant höhere Anteile von CD29⁺ Zellen in allen Differenzierungsstadien im Vergleich der Gesunden gegenüber den AML-Proben nach 'DC'-Stimulation

Zusammenfassend lässt sich festhalten: Das T-Zell Profil von AML- und gesunden Proben zeigte eine Verschiebung hin zu Profilen mit höheren Anteilen von T-Zellen mit Effektorphänotyp. Im Vergleich zeigten AML-Patienten geringere Anteile von T_{cm} , Aktivierungsmarker- und β -Integrin positiven T-Zellen, aber dafür höhere Anteile an T_{eff} . Interessanterweise konnten wir keine signifikanten Unterschiede der T-Zell-Profile zwischen 'DC'- und 'MNC'-stimulierten Proben feststellen.

4.3 Kinetik

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben konnten wir während der T-Zell-Stimulation in der MLR eine Verschiebung des T-Zell-Differenzierungsmusters von Zellen mit hohem Proliferationspotential zu Zellen mit Effektorfunktion, sowie eine Zunahme von aktivierten T-Zellen verzeichnen. Im Folgenden untersuchten wir den zeitlichen Ablauf dieser Prozesse anhand einer Kinetik mit Messungen der T-Zellprofile an Tag 1,3,5 und 7.

4.3.1 In CD4⁺ T-Zellen, anders als bei CD8⁺ T-Zellen, vollziehen sich Änderungen des T-Zellprofiles innerhalb der ersten 5 Tage.

T_{naive} und T_{cm} nahmen unter Stimulation sukzessive ab. T_{cm} zeigten zu Beginn (Tag 1) eine kurze Phase der Proliferation ehe diese ebenfalls eine Abnahme zeigten. Im Gegensatz dazu stiegen die Anteile der T_{eff} und T_{non-naive} kontinuierlich an. Diese Entwicklung konnten wir sowohl bei den AML-Patienten als auch in der gesunden Vergleichsgruppe feststellen. Es zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede nach ‘DC’- und ‘MNC’-Stimulation, so dass hier in dieser Darstellung lediglich die Diagramme für ‘DC’-stimulierte AML-Proben abgebildet werden sollen (siehe Abb.13). Erwähnenswert ist der Fakt, dass die CD4⁺ T-Zellen bereits an Tag 5 ein Gleichgewicht erreichten welches sich bis zu Tag 7 nicht änderte, wohingegen in CD8⁺ Zellen keinerlei Plateaus auszumachen waren. Insgesamt konnten wir in jeder Probe, sowohl von Gesunden als auch von AML-Patienten eine Verschiebung des Differenzierungsmusters feststellen.

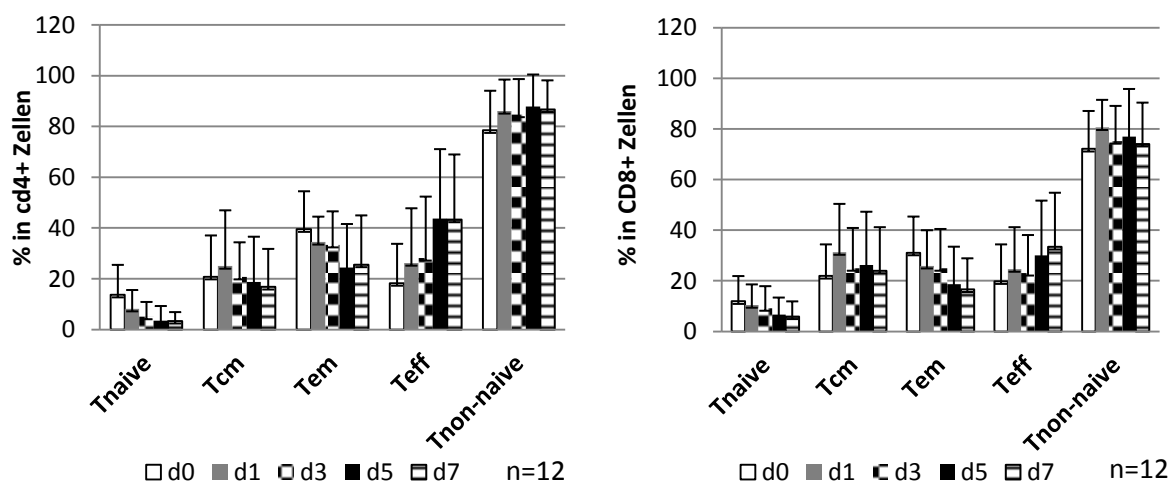


Abbildung 13 Kinetik der T-Zell-Differenzierungsstadien während ‘DC’-Stimulation bei AML-Patienten. Die Anteile von T_{naive}, T_{em} und T_{cm} nahmen während der T-Zellstimulation sowohl in CD4⁺ als auch CD8⁺ Zellen ab, wohingegen T_{eff} und T_{non-naive} zunahmen. T_{cm} zeigte dabei einen Anstieg mit Gipfel an Tag 1. In CD4⁺ T-Zellen, ungleich den CD8⁺ T-Zellen, stellte sich bereits nach Tag 5 ein Gleichgewicht der T-Zell-Differenzierungsstadien ein.

4.3.2 CD69 zeigt Eigenschaften eines frühen Aktivierungsmarker, CD71 und CD154 die eines „späten“. CD28 und CD137 blieben in ihrer Expression konstant.

Ähnlich wie bei den Kinetiken über die Entwicklung der T-Zellen durch verschiedene Differenzierungsstadien, fanden wir auch bei den Aktivierungsmarkern vergleichbare Ergebnisse nach ‘DC’- und ‘MNC’-Stimulation bei gesunden Proben und AML-Patienten. Des Weiteren zeigten sich ähnliche kinetische Verläufe bei Gesunden wie auch bei AML, so dass im Folgenden exemplarisch die Kinetik der Aktivierungsmarker bei den ‘DC’-

stimulierten T-Zellen dargestellt wird. Auf Unterschiede wird im Text hingewiesen, auf eigene Abbildungen wird verzichtet.

In der Entwicklung aktivierter T-Zellsubpopulation über die Zeit konnten wir unterschiedliche Verläufe feststellen. CD69 zeigte, wie in der Literatur beschrieben, eine frühe Steigerung der Expression auf T-Zellen. Bereits nach 24h wurde der Höchstwert, welcher bei $24 \pm 14\%$ ($p < 0.001$ gegenüber dem Tag 0) lag erreicht. Ab Tag 3 konnte dann eine „Herabregulierung“ des Markers festgestellt werden. CD71 hingegen, als späterer Proliferationsmarker, wies die höchsten Anteile an Tag 5 auf ($31 \pm 13\%$), jedoch konnte bereits an Tag 1 eine Steigerung und an Tag 3 eine signifikante ($p = 0.01$) Änderung im Vergleich zu Tag 0 gemessen werden. Die Anteile CD28⁺ und CD137⁺ Zellen zeigten überraschenderweise keinerlei signifikante Schwankungen und blieben auf relativ konstantem Niveau. Auf die generell höheren Anteile dieser beiden Marker in gesunden Proben wurde in den beiden vorangehenden Kapiteln schon eingegangen. Die Anteile CD154⁺ T-Zellen nahm langsam zu, mit einem Höhepunkt an Tag 7. Bei diesem Marker lässt sich nun erstmals ein deutlicher Unterschied in der Kinetik von T-Zellen der AML-Patienten im Vergleich zu den T-Zellen der gesunden Probanden feststellen. Im Gegensatz zu den AML-Patienten zeigten die gesunden Probanden keine Zunahme der CD154⁺ T-Zellen.

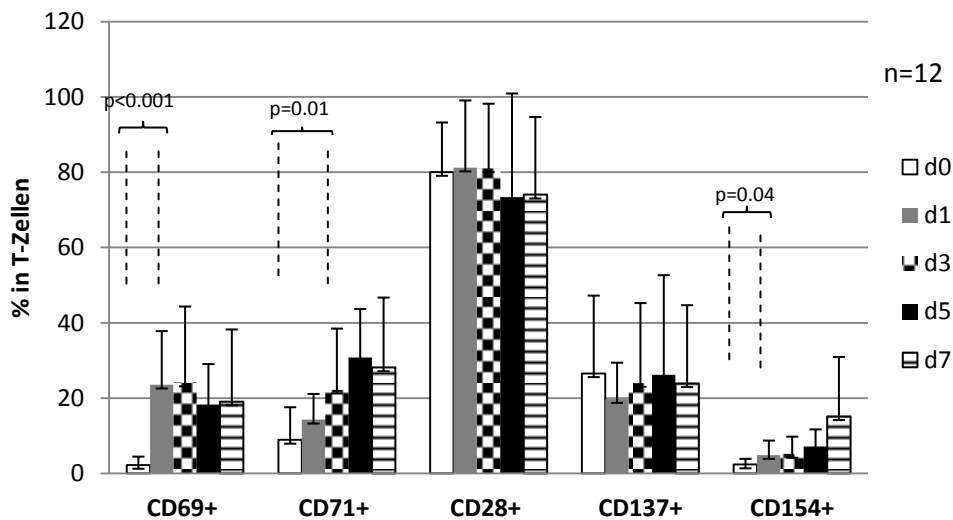


Abbildung 14 Kinetik der Aktivierungsmarker von AML-Patienten nach ‘DC’-Stimulation. CD69 zeigte eine frühe Hochregulation mit Höchstwert an Tag 1, wohingegen CD71 und CD154 erst nach Tag 5 bzw. 7 den Höhepunkt ihrer Expression erreichen. CD28 und CD137 zeigten eine konstante Expression während Stimulation.

Die Stimulation durch ‘DC’ und ‘MNC’ führte bei den naiven T-Zellen zu einer Herabregulierung von $\beta 7$ -Integrin-positiven Zellen, sowohl bei Gesunden als auch bei AML-

Patienten. Ähnliches gilt für $\beta 7$ -Integrin-exprimierende T_{em+eff} , bei denen eine sukzessive Abnahme über die Zeit beobachtet werden kann. Interessanterweise konnten wir dieses Phänomen nicht bei T_{cm} erkennen. In Hinblick auf CD29 wurde zunächst eine geringe Zunahme der Anteile von $CD29^+ T_{naive}$ gemessen, ehe ein Rückgang ähnlich den $CD29^+ T_{em+eff}$ beobachtet wurde. Die Anteile von $CD29^+ T_{cm}$ waren keinen Schwankungen unterworfen. Bei den gesunden Probanden konnten derlei Dynamiken nicht festgestellt werden, es zeigte sich ein konstant hoher Level an $CD29^+$ Zellen in allen Differenzierungsstadien der T-Zellen (Siehe Abb.15).

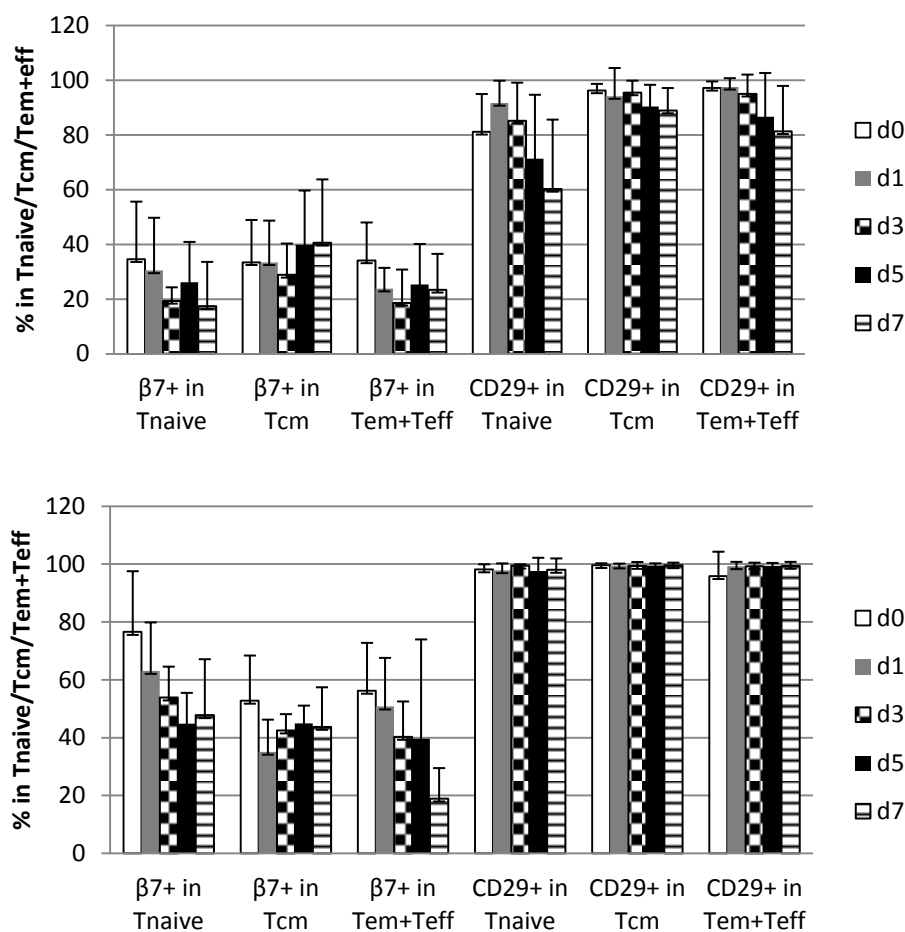


Abbildung 15 Kinetik von $\beta 7$ -Integrin⁺ und CD29⁺ Zellen in den unterschiedlichen T-Zell-Differenzierungsstadien von AML Patienten (oben) und gesunden Probanden (unten) unter 'DC'-Stimulation. Sowohl bei gesunden als auch bei AML-Proben nahmen die Anteile von $\beta 7^+$ T-Zellen in den T_{naive} als auch auf T_{em+eff} im Gegensatz zu T_{cm} ab. Die Anteile von CD29⁺ T-Zellen bei AML nehmen sukzessive ab, wohingegen gesunden T-Zellen konstante Anteile von CD29 aufweisen.

Im Folgenden interessierten uns die funktionellen Eigenschaften der stimulierten T-Zellen. Anhand eines Zytotoxizitätstest (Durchführung siehe Material und Methoden) konnten wir die

lytische Aktivität der stimulierten T-Zellen messen und diese je nach Ergebnis einer „Lysierer“ und „Nicht-Lysierer“ Gruppe zuordnen. Diese beiden Gruppen wurden Analog zu Kapitel 4.1 und 4.2 im Hinblick auf ihre Zusammensetzung der T-Zelldifferenzierungsstadien, Aktivierungsmarker und die β -Integrine untersucht.

4.4 Lyseverhalten

4.4.1 ‘DC’-stimulierte T-Zellen lysieren Blasten besser als ‘MNC’-stimulierte T-Zellen.

Es wurde deutlich, dass eine ‘DC’-Stimulation der ‘MNC’-Stimulation in funktioneller Hinsicht überlegen ist. 7 der 11 (64%) Proben nach ‘DC’-Stimulation zeigten eine Lyse der Blasten, im Gegensatz zu ‘MNC’-stimulierten Zellen mit nur 4 von 10 (40%) bzw. unstimulierten T-Zellen mit 4 von 9 (44%) Proben, welche als Negativ-Kontrolle ebenfalls getestet wurden. (Siehe Tabelle 8)

Patienten No.	FAB-type	Stadium	T-Zell-Quelle	Lyse durch unstimulierte T-Zellen	Lyse durch ‘MNC’-stimulierte T-Zellen	Lyse durch ‘DC’-stimulierte T-Zellen
887	MDS/CMML	Pers. v. SZT	autolog/ vor SZT	+	+	+
914	sAML	Rez n. SZT	autolog/ vor SZT	-	-	-
824	M1	Dgn.	autolog/ vor SZT	n.d	-	+
748	M2	Dgn.	autolog/ vor SZT	-	-	-
855	M4	Dgn.	autolog/ vor SZT	n.d.	n.d.	n.d
948	M5	Dgn.	autolog/ vor SZT	-	-	+
m569	M0	Pers. n. SZT	nach SZT	+	+	+
853	M0	Rez n. SZT	nach SZT	n.d.	n.d.	+
m761	M1	pers. n. SZT	nach SZT	+	-	-
880	M2	Rez n. SZT	nach SZT	+	+	+
458	M4	Rez n. SZT	nach SZT	-	-	-
938	M4	Rez n. SZT	nach SZT	+	+	+

Tabelle 8 Ergebnisse des Zytotoxizitätstest von T-Zellen nach 7 Tagen Stimulation mit ‘DC’, ‘MNC’ sowie von unstimulierten T-Zellen. Dgn. = Erstdiagnose; Rez. v. SZT = Rückfall vor SZT; pers. = Persistenz; Rez. n. SZT = Rückfall nach SZT; Pers.n.SZT = Persistenz nach SZT; n.d.= ohne Ergebnis/ nicht durchgeführt

4.4.2 „Blasten-Lysierer“ sind durch deutlich höhere Werte an T_{naive} und T_{cm} und geringere Werte an T_{eff} und $T_{non-naive}$ gekennzeichnet

Wir konnten zeigen, dass Fälle, die nach Stimulation Blasten lysierten, vor Stimulation höhere Werte an $CD8^+T_{naive}$ ($p=0.06$) und $CD8^+T_{cm}$ und geringere Werte für $CD8^+T_{em}$, $CD8^+T_{eff}$ und $CD8^+T_{non-naive}$ ($p=0.08$) im Vergleich zu Fällen, ohne Blasten-lytische Aktivität aufwiesen

(siehe Abb.16). Vergleichbare Verhältnisse fanden wir in $CD4^+$ T-Zellen vor: Vor Stimulation zeigten die Lysierer höhere Anteile an T_{naive} und T_{cm} sowie geringere Anteile an T_{em} , T_{eff} und $T_{non-naive}$ ($p=0.05$) (Daten nicht abgebildet).

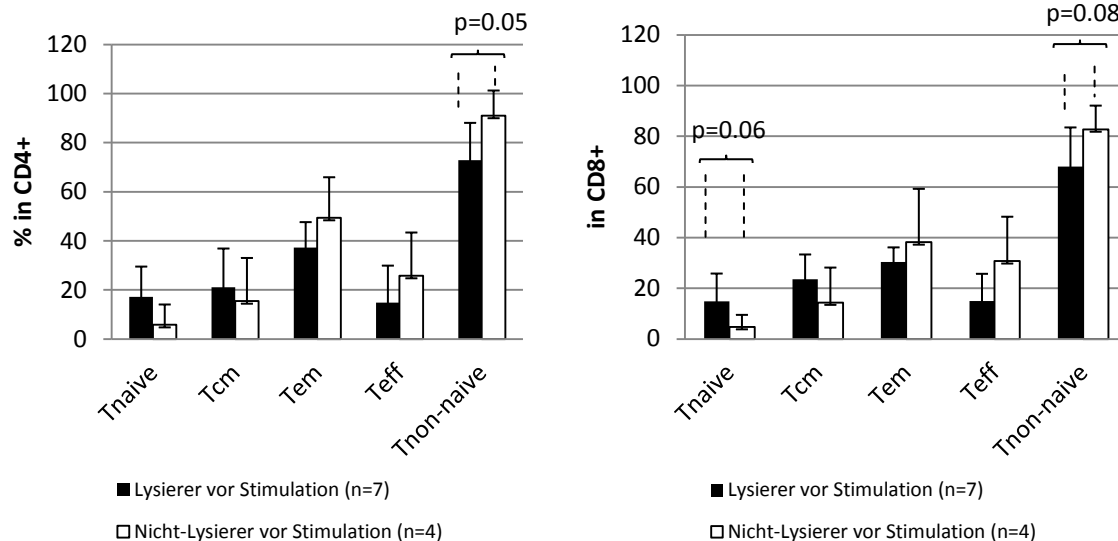


Abbildung 16 AML-Patienten vor ‘DC’-Stimulation, eingeteilt in spätere Lysierer und Nicht-Lysierer. Die Lysierer präsentieren sich mit deutlich höheren Werten für T_{naive} und T_{cm} und geringeren Werten für T_{eff} und $T_{non-naive}$ in der $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellfraktion.

4.4.3 Die T-Zell-Differenzierungsmuster von T-Zellen, die nach ‘DC’-oder ‘MNC’-Stimulation antileukämische Eigenschaften besitzen, unterscheiden sich nicht von T-Zellen ohne blastenlytische Eigenschaften.

Wie Abbildung 17 zeigt, waren die Werte in den $CD4^+$ oder $CD8^+$ -Subpopulationen an T_{naive} , T_{cm} und T_{eff} der Lysierer als auch Nicht-Lysierer im Verlauf der MLR vergleichbar und wiesen keine signifikanten Unterschiede am Tag des Lysetests auf. Wir konnten lediglich höhere Werte von $T_{non-naive}$ und T_{em} bei den Lysierern im Vergleich zu den Nicht-Lysierern nach ‘DC’-Stimulation, als auch in T_{em} nach ‘MNC’-Stimulation messen, wobei jeweils kein Signifikanzniveau erreicht wurde. Im Allgemeinen konnte kaum ein Unterschied in den T-Zellzusammensetzungen nach ‘DC- und ‘MNC’ –Stimulation, weder in der Lysierer noch in der Nicht-Lysierer Gruppe, festgestellt werden.

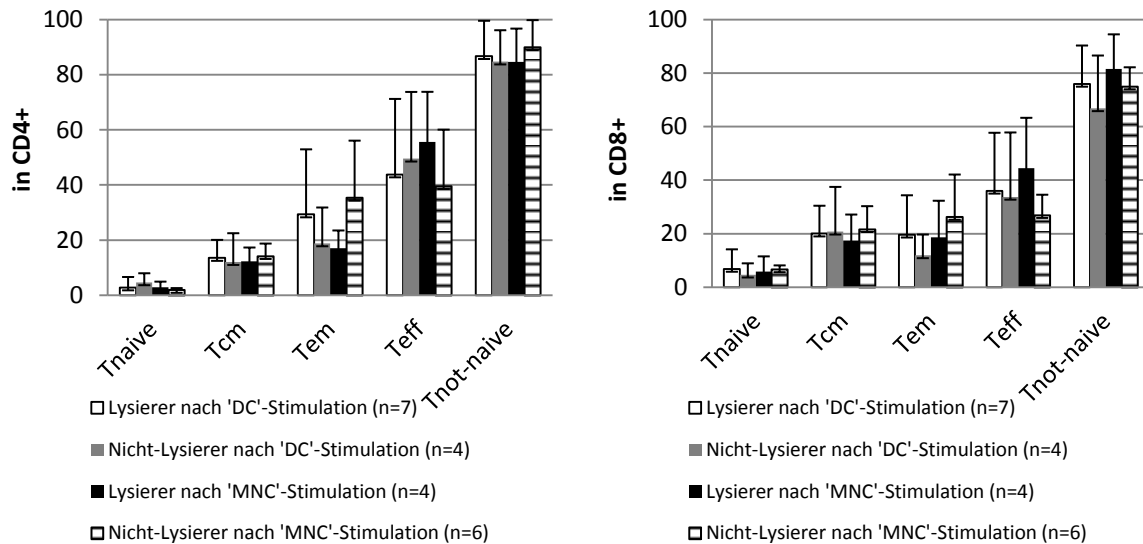


Abbildung 17 Vergleich der AML-Proben, eingeteilt in Lysierer und Nicht-Lysierer, nach ‘DC’-/‘MNC’-Stimulation. Es zeigt sich ein vergleichbares Bild ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationsarten bei Lysierern und Nicht-Lysierern.

Wie Abbildung 18 zeigt, sind die T-Zell-Aktivierungsmarker-Profile der Proben mit Lyseaktivität verglichen mit den Proben ohne Lyseaktivität vor als auch nach ‘DC’ sowie ‘MNC’-Stimulation vergleichbar. Es fiel lediglich ein höherer Anteil an $CD28^+$ T-Zellen in den Proben mit im Vergleich zu den Proben ohne lytische Aktivität auf. Zusätzlich zeigte sich ein höherer Anteil an $CD137^+$ und ein niedrigerer Anteil an $CD71^+$ T-Zellen vor Stimulation, wobei diese Unterschiede nicht signifikant waren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der zeitliche Verlauf der Stimulation untersucht werden. Da die Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen oftmals nur temporär und nicht konstitutiv ist, entschlossen wir uns auch die Tage 1,3 und 5 zu analysieren und die Proben in Fälle mit und ohne antileukämische Funktionalität nach 7 Tagen einzuteilen. Die Gruppe der Lysierer zeigte signifikant höhere Anteile von $CD69^+$ T-Zellen während ‘DC’-Stimulation als die Nicht-Lysierer. Besonders deutlich waren die Unterschiede an Tag 1 ($p=0.1$), 3 und 5 ($p=0.006$). An Tag 7 waren die Werte der beiden Gruppen dann vergleichbar. Erstaunlicherweise ließ sich ein inverses Verhalten bei ‘MNC’-stimulierten T-Zellen feststellen. Hierbei zeigten Nicht-Lysierer bis einschließlich Tag 3 höhere Anteile an $CD69^+$ T-Zellen. Ähnliche Verläufe konnten wir für CD137 messen. So präsentierten sich die „Lysierer“ nach ‘DC’-Stimulation mit signifikant höheren Werten für CD137 an den Tagen 1 ($p=0.006$), 3 ($p=0.08$) und 5 ($p=0.05$) im Vergleich zur ‘MNC’-Stimulation, bei der keine signifikanten Unterschiede festzumachen waren. Interessanterweise zeigte CD71 ein sich von CD69 unterscheidendes Profil. Lediglich an Tag 5 zeigten sich eindeutig höhere Werte der ‘DC’-stimulierten Lysierer

gegenüber den Nicht-Lysierern bei CD71⁺Zellen. Auffällig war ebenfalls die Abnahme von CD28⁺T-Zellen der Fälle, die nicht lysierten. Dieser Trend setzte bereits ab Tag 1 der Stimulation ein und galt sowohl für ‘DC’- als auch ‘MNC’-Stimulation. Für CD154⁺Zellen konnten keine nennenswerten Unterschiede verzeichnet werden (Daten nicht abgebildet).

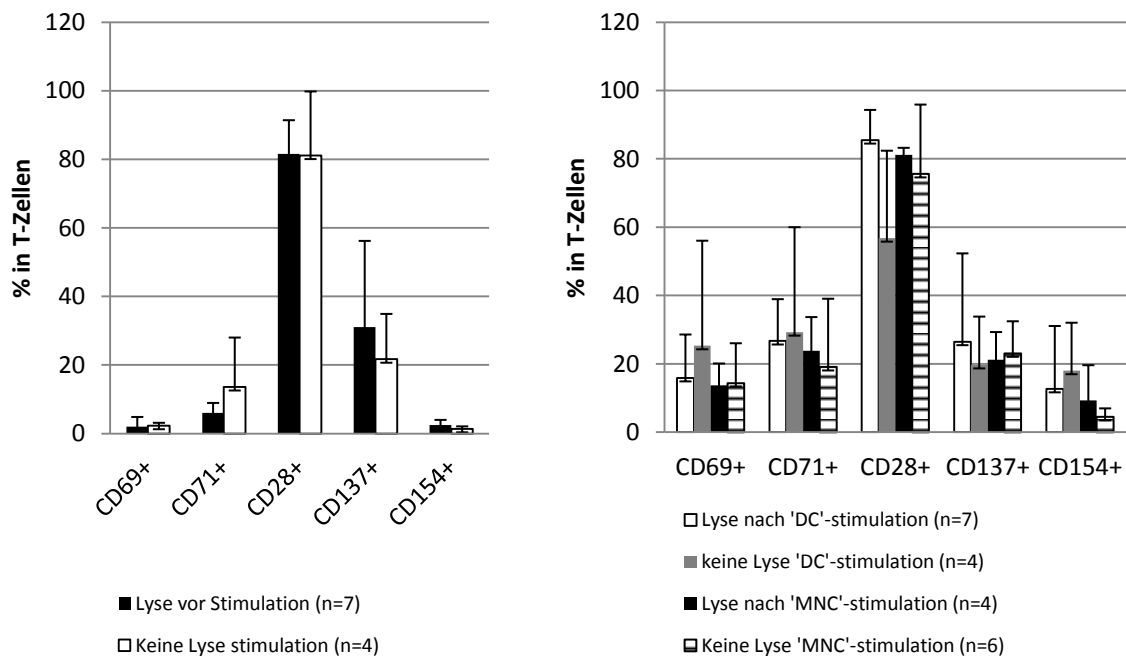


Abbildung 18 Vergleich der AML-Zellproben, eingeteilt in Lysierer und Nicht-Lysierer, nach 7 Tagen ‘DC’ -/‘MNC’-Stimulation im Bezug auf die Aktivierungsmarker. Es zeigt sich ein vergleichbares Bild ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Stimulationsarten bei Lysierern und Nicht-Lysierern.

Vor Stimulation wiesen T-Zellen, die im späteren Lysetest Blasten lysierten, signifikant höhere Werte von CD29 in T_{naive} (p=0.05), T_{cm} (p=0.03) und T_{em+eff} auf. Ebenso fiel ein stärkerer Anteil von β7-Integrin⁺ T_{naive} und T_{em+eff} auf, wohingegen die Nicht-Lysierer größere Anteile β7-Integrin auf T_{cm} präsentierten.

An Tag 7 zeigte sich uns ein uneinheitliches Bild. Im Allgemeinen war der Anteil von β7-Integrinen⁺ Zellen in allen Differenzierungsstadien sowohl nach ‘DC’- als auch ‘MNC’-Stimulation in den Lysierern höher als in den Nicht-Lysierern, auch wenn lediglich für die ‘MNC’-stimulierte T_{em+eff} ein signifikanter Unterschied gemessen werden konnte (p=0.04). Der Anteil an CD29⁺ T-Zellen nach ‘MNC’-Stimulation war bei Lysierern stets höher als bei Nicht-Lysierern (T_{em+eff} p=0.06), was nach ‘DC’-Stimulation lediglich in den T_{em+eff} zu sehen war. In T_{naive} und T_{cm} war der Anteil der CD29⁺Zellen leicht unter dem Niveau der Nicht-Lysierer.

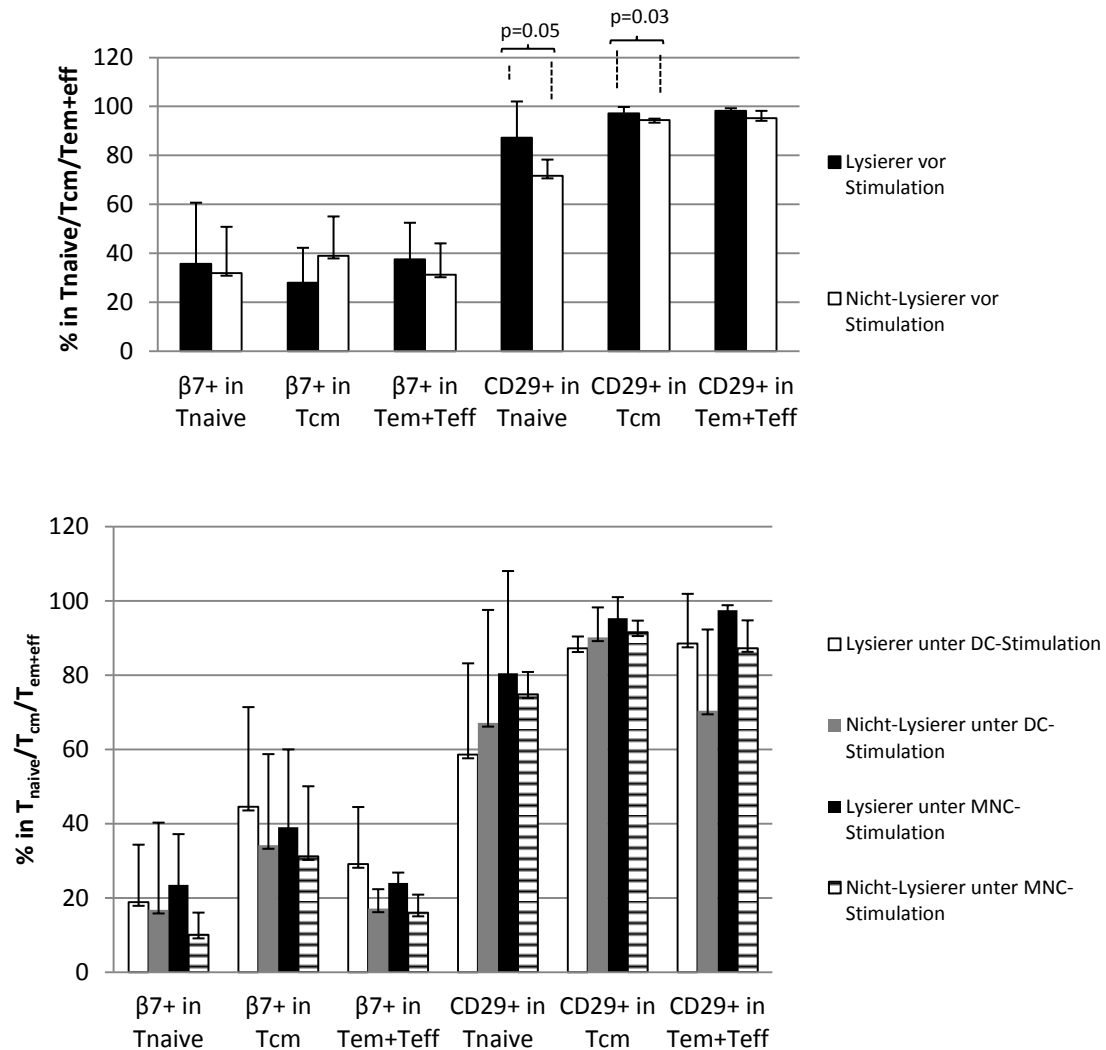


Abbildung 19 Vergleich der AML-Proben, eingeteilt in Lysierer und Nicht-Lysierer nach ‘DC’-/‘MNC’-Stimulation. Es werden die Anteile von $\beta 7$ -Integrin und CD29 auf den Unterschiedlichen T-Zell-Subtypen aufgezeigt. Vor Stimulation zeigen die Lysierer größere Anteile an β -Integrin+ Zellen. Nach Stimulation ergibt sich ein uneinheitliches Bild ohne signifikante Unterschiede.

Im Allgemeinen lässt sich festhalten, dass Lysierer höhere Anteile an aktivierten T-Zellen zeigten als Nicht-Lysierer. Insbesondere während der Stimulation waren Unterschiede im Expressionsprofil zu sehen. Die Aktivierungsmarker CD69, CD28 und CD137 zeigten dies deutlich. Allerdings trifft dies nur für die ‘DC’-Stimulation zu und nicht für die ‘MNC’-Stimulation, bei welcher sich ausgeglichene Verhältnisse zeigten.

4.5 ‚Cut-off Werte‘

4.5.1 ‚Cut-off Werte‘ an T_{naive} , T_{cm} und T_{eff} als auch an T-Zell-Aktivierungsmarkern können dazu beitragen, die antileukämische Funktionalität von unstimulierten und ‘DC’-stimulierten T-Zellen vorherzusagen

Basierend auf diesen Ergebnissen haben wir Cut-off Werte ermittelt, die dabei helfen, die lytische Aktivität von T-Zellen in Blastenlysetest vorherzusagen. Dabei ermittelten wir die Werte, die die beste Einteilung und Abgrenzung von Lysierern und Nicht-Lysierern erlaubte. Interessanterweise ließen sich diese Cut-off Werte nur für die ‘DC’-stimulierten T-Zellen bestimmen, wohingegen bei ‘MNC’-stimulierten T-Zellen auf Grund einer größeren Streuung der Ergebnisse keine Grenzwerte bestimmt werden konnten. Wir fanden, dass Fälle mit höheren Anteilen als 7,5% an T_{naive} und als 12% von T_{cm} in $CD8^+$ Zellen und geringeren Anteilen von T_{eff} als 24% in 75-86% der Fälle antileukämische T-Zell Aktivität zeigten (siehe Abbildung 20). In Umkehr zeigten nur 40% bzw. 25% der Fälle mit Anteilen von T_{naive} bzw. T_{cm} unter diesen Grenzwerten die Fähigkeit Blasten zu lysieren. Dieselben Cut-off Werte konnten für ‘DC’-stimulierte T-Zellen angewandt werden. Interessanterweise zeigte sich dabei, dass 71% der Fälle mit $T_{naive} < 7,5\%$ in $CD8^+$ eine zelllytische Aktivität im *ex-vivo* Test zeigten. Im Gegensatz dazu gingen Proben mit Anteilen $>12\%$ von T_{cm} und $> 24\%$ von T_{eff} in $CD8^+$ mit guter antileukämischer T-Zellreaktivität einher (Lyse in 71% der Fälle bei $CD8^+T_{cm} > 12\% / CD8^+T_{eff}$). Ähnliche Ergebnisse konnten für $CD4^+ T_{naive}$, $CD4^+T_{cm}$ und $CD4^+T_{eff}$ ermittelt werden (Daten nicht abgebildet).

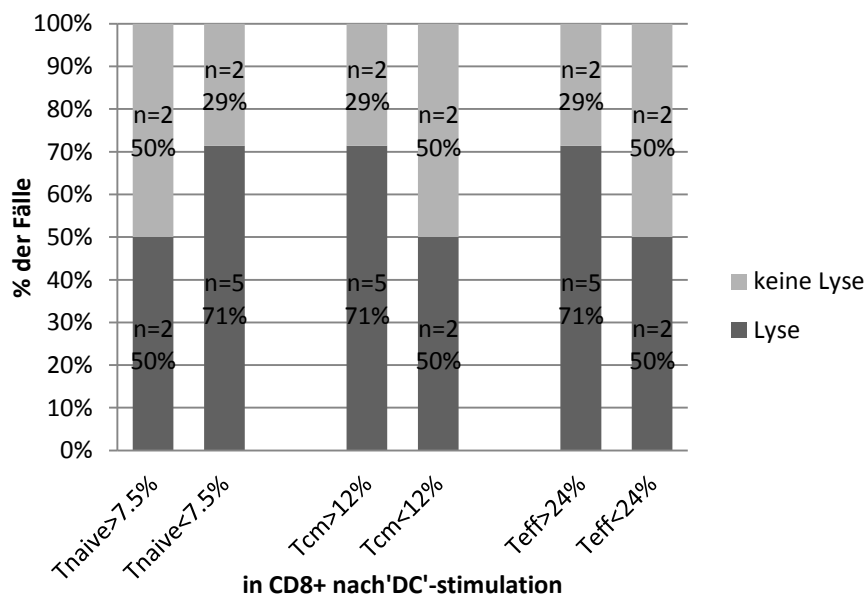
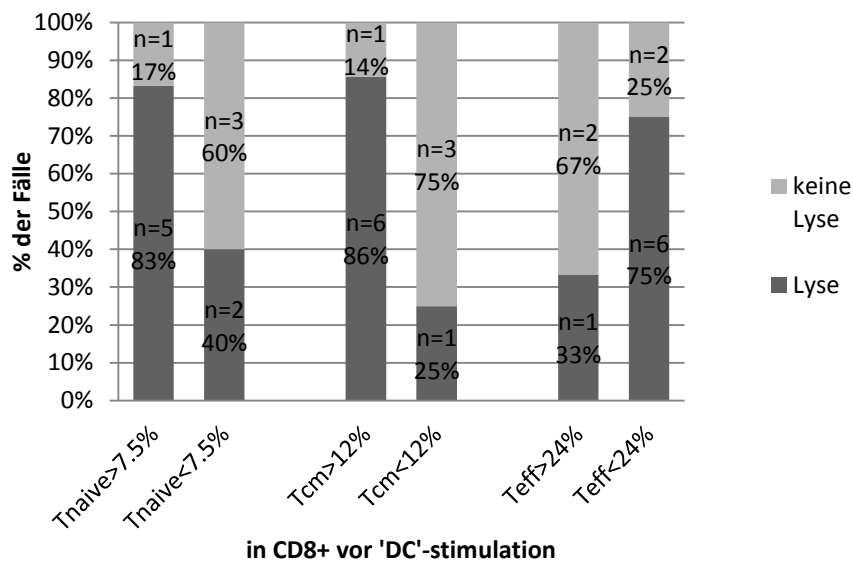


Abbildung 20 Cut-off Werte vor und nach Stimulation helfen die antileukämische Funktionalität im Lysetest vorherzusagen bzw. prognostische Grenzwerte zu erstellen. Patienten mit $T_{naive} > 7.5\%$ und $T_{cm} > 12\%$ bzw. $T_{eff} < 24\%$ vor Stimulation und $T_{naive} < 7.5\%$ und $T_{cm} < 12\%$ bzw. $T_{eff} > 24\%$ zeigten in mehr als 71% der Fälle zu einer Blastenlyse.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Expression von Aktivierungsmarkern ebenso die antileukämische T-Zell-Antwort vorhersagen kann. Im Allgemeinen lässt sich zusammenfassen, dass Fälle mit höheren Anteilen an aktivierten T-Zellen nach T-Zell Stimulation eine bessere lytische Funktionalität zeigten, wenn auch nicht für alle Aktivierungsmarker ein Cut-off Wert bestimmt werden konnte. Im Gegensatz dazu korrelierten niedrige Anteile an $CD69^+$ und $CD71^+$ T-Zellen vor Stimulation mit höherer antileukämischer Funktionalität im *ex vivo* Test. 100% bzw. 83% der Fälle mit $CD69^+CD3^+$

<1.5% bzw. $CD71^+CD3^+ <6\%$ vor 'DC'-Stimulation waren in der Lage, Blasten zu lysieren. Da sich während der Stimulation die Expression von Aktivierungsmarkern auf T-Zellen hohen Schwankungen unterworfen ist, war es nicht möglich nach 'DC'-Stimulation die gleichen Cut-off Werte zu verwenden wie vor der Stimulation. Deshalb mussten wir neue Cut-off Werte ermitteln. Jedoch zeigte sich, dass lediglich für CD28 und CD154 Cut-off Werte zu ermitteln waren (Daten nicht abgebildet). Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, war es sinnvoll, bei den Aktivierungsmarkern auch die Tage 1,3 und 5 mit in die Überlegungen einzubeziehen, da einige T-Zell-Aktivierungsmarker nur temporär exprimiert werden und an Tag 7 nicht mehr nachweisbar sind. Also teilten wir die Patienten, je nach ihren Ergebnissen im Lysetest, nach Tag 7 in eine Lyse oder Nicht-Lyse Gruppe ein und verglichen diese beide Gruppen zusätzlich an den Tagen 1, 3 und 5. Abbildung 21 zeigt die Aktivierungsmarker an Tag 5: T-Zellen erlangten in 80-100% der Fälle Blasten lytische Funktionalität, wenn die Proben $>19\% CD69^+CD3^+$, $>18\% CD^+CD3^+$, $>85\% CD28^+CD3^+$ und $>11\% CD137^+CD3^+$ enthielten. Ähnliche Cut-off Werte konnten wir für Tag 1 (CD69, CD71 und CD137) und 3 (CD137) ermitteln (Daten nicht abgebildet).

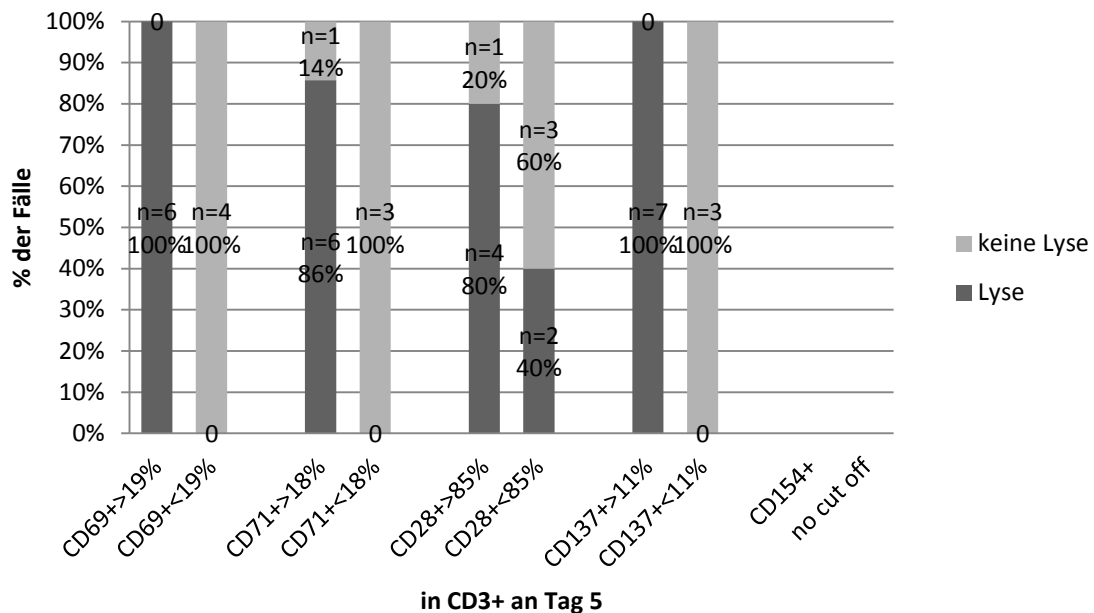
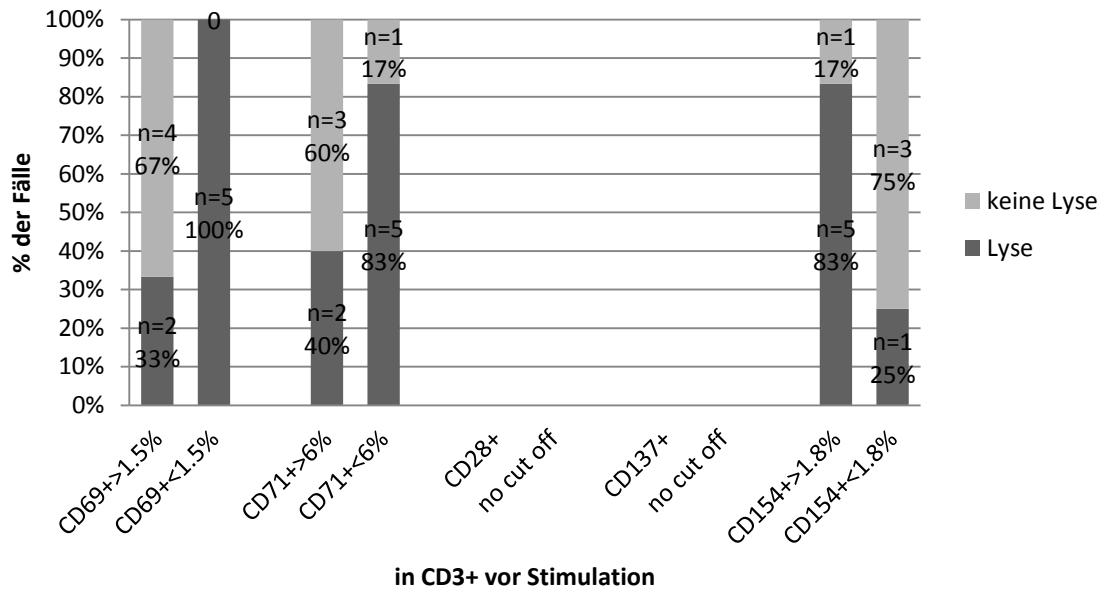


Abbildung 21 Cut off Werte vor und nach Stimulation im Bezug auf Aktivierungsmarker. Patienten unter den definierten Grenzwerten vor, bzw. über den definierten Grenzwerten nach Stimulation zeigten in der Mehrzahl der Fälle lytische Aktivität im Lysetst.

Des Weiteren fanden wir, dass lytisch aktive T-Zellen höhere Anteile an $\beta 7$ -Integrin⁺ T-Zellen besaßen als T-Zellen ohne lytische Aktivität. Wie Abbildung 22 zeigt, lysieren 71-100% der Fälle mit $\beta 7^{+}T_{em+eff} > 26\%$, $CD29^{+}T_{naive} > 79\%$, $CD29^{+}T_{cm} > 95\%$, $CD29^{+}T_{em+eff} > 97\%$ vor 'DC'-Stimulation Blasen im *ex-vivo* Lysetest. Ähnliche Werte konnten wir für T_{em+eff} nach 'DC'-Stimulation erkennen. Alle Fälle mit $\beta 7^{+}T_{em+eff} > 26\%$ oder $CD29^{+}T_{em+eff} > 90\%$ zeigten lytische Aktivität. Überraschenderweise fanden wir gegenteilige Ergebnisse für T_{naive} und T_{cm} nach 'DC'-Stimulation. Hier war kein Fall mit $CD29^{+}T_{naive} > 79\%$ und $CD29^{+}T_{cm}$

>95% in der Lage Blasten zu lysieren. Geringere Anteile von CD29⁺T_{naive} und CD29⁺T_{cm} gingen mit guter antileukämischer Funktionalität einher.

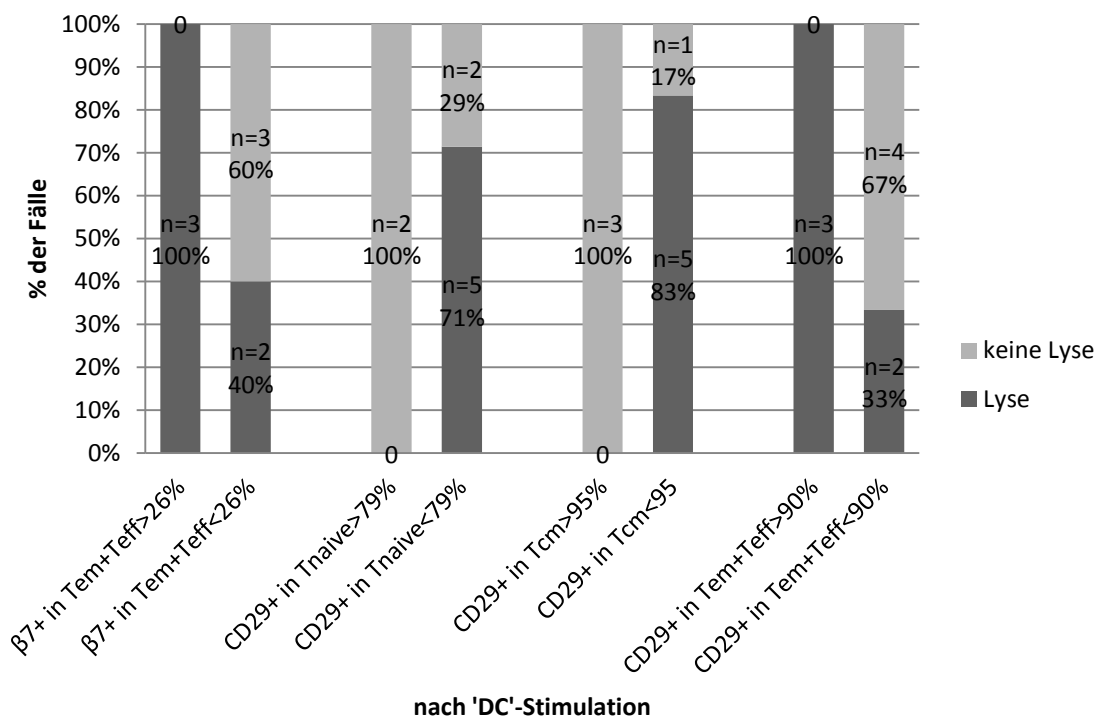
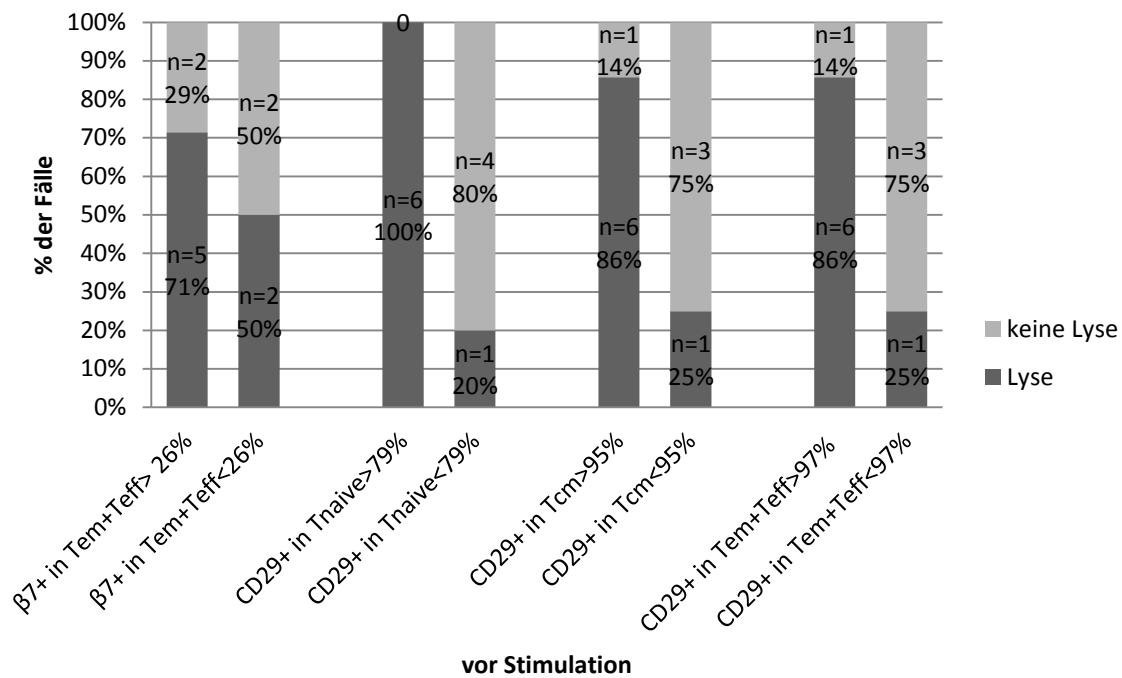


Abbildung 22 Cut-off Werte für β-Integrin⁺Zellen vor und nach Stimulation, anhand derer prädiktive bzgl. antileukämischen Funktionalität im Lysetest abgeschätzt werden kann. Genauere Erläuterungen siehe Text.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass höhere Werte an T_{naive} , T_{cm} und β -Integrinen in allen T-Zell-Subtypen, und niedere Werte an aktivierten T-Zellen vor 'DC'-Stimulation mit einer guten antileukämischen T-Zell Aktivität einhergehen. Nach 'DC'-Stimulation hatten Patienten der lytischen Gruppe höhere Anteile an T_{cm} , T_{eff} , und hohe Anteile an aktivierten T-Zellen und β -Integrinen auf T_{em+eff} . Interessanterweise zeigten sie dabei geringere Werte für T_{naive} sowie $CD29^{+}T_{naive}$ und $CD29^{+}T_{cm}$.

5. Diskussion

5.1 Die Rolle von T-Zellen in der Tumorabwehr

Allogene SZT ist die einzige kurative Therapieoption für Patienten mit AML, wobei die Spender-T-Zellen einen starken antileukämischen Effekt erzeugen, auch wenn Rückfälle auftreten können (Kolb, 2008; Schmid et al., 2007; Schmid et al., 2012a). Im Rahmen der zellulären Immunantwort kommen T-Zellen eine zentrale Bedeutung zu (Schmetzer et al., 2007). In gesunden Individuen werden sie von DC oder anderen Antigen präsentierenden Zellen stimuliert und entwickeln daraufhin eine spezifische T-Zellantwort, resultierend in der Präsenz einer hohen Anzahl von Effektor T-Zellen. Darüber hinaus wird ein T-Zell-Gedächtnis gebildet, welches eine schnelle und effektive Antwort auf eine erneute Konfrontation mit dem bekannten Antigen erlaubt (Roberts, Ely, and Woodland, 2005). Das Verbreichen von DLI, führt in vielen Fällen zu einer kompletten Remission und einer langfristigen Heilung der Patienten. Allerdings nicht in allen Fällen. Im Gegenteil provozierte die DLI-Gabe teilweise sogar eine Aggravation der Erkrankung (Kolb, 2008; Kremser et al., 2010; Roddie et al., 2006; Schmid et al., 2012b; Schuster et al., 2008).

Bisher steht wenig Wissen bezüglich der Entwicklung und Aktivierung verschiedener T-Zell-Subtypen sowie ihrer antileukämischen Funktionalität unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zur Verfügung. Ein Wissenszuwachs auf diesem Gebiet könnte dazu beitragen definierte T-Zell Subpopulationen aufzuarbeiten, zu manipulieren und die Immuntherapie zu verbessern.

5.2 Die beste Strategie zur T-Zell Charakterisierung

In Voruntersuchungen verglichen wir verschiedene in der Literatur beschriebene Ansätze und Strategien zur Charakterisierung von T-Zellen und ihrer Subtypen (Berger et al., 2008; Fallen et al., 2003; Klebanoff et al., 2005; Sallusto and Lanzavecchia, 2011; Sallusto et al., 1999). Ziel war, ein in der Durchführung einfaches und dennoch zuverlässiges T-Zell-Panel für die qualitative und quantitative T-Zell Charakterisierung unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zu finden. Wie in Kapitel „Material und Methoden“ beschrieben, stellten sich CD45RO, CD27 und CCR7 als ideale Marker für die Charakterisierung der T-Zell Subtypen T_{naive} , T_{cm} , T_{em} T_{eff} und $T_{non-naive}$ heraus (Fallen et al., 2003; Sallusto and Lanzavecchia, 2011). Hierbei ergab sich zusätzlich die Möglichkeit der Analyse von 4 gleichzeitig kombinierten Oberflächenmarkern (z.B. $CD4^+$, $CD8^+$, $CD29^+$ etc.) in einem 4

Kanal-Flowzytometer. Auf Grund des Vorkommens von $CD45RA^+T_{em}$ (T_{emRA}) entschlossen wir uns $CD45RO$ für die Unterscheidung von T_{naive} und T_{cm} zu nutzen, um Interferenzen durch $CD45RA^+T_{em}$ (T_{emRA}) vorzubeugen. (Ibana et al., 2012; Sallusto and Lanzavecchia, 2011)

Die von Berger et al. entwickelte alternative Strategie zur T-Zell Charakterisierung konnten wir nicht reproduzieren (Berger et al., 2008): In unseren Versuchen konnten wir, verglichen mit den oben genannten T-Zell Panels von Fallen, Sallusto oder Klebanoff, nur 10% der T-Zellpopulationen mit dem Berger-Panel detektieren. Dies ist möglicherweise einer spezialisierten Gating/Quantifikations- Strategie geschuldet, welche wir nicht reproduzieren konnten. Alternativ ist auch möglich, dass Berger et al. andere T-Zellsubtypen charakterisierten, welche sich in ihrem Profil und vielleicht auch ihren Eigenschaften von den unseren unterscheiden.

Demzufolge verwendeten wir eine modifizierte T-Zell Charakterisierungsstrategie, welche auf den Arbeiten von Fallen, Sallusto und Klebanoff basiert.

5.3 Vergleich von T-Zell Subtypen in AML-Patienten und gesunden Probanden

Die Zusammensetzung unstimulierter T-Zellen von AML Patienten unterschieden sich von T-Zellen gesunder Probanden: Unsere Daten zeigten, dass unkultivierte T-Zellen von AML Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, sowohl vor (autologe T-Zellen) also auch nach SZT höhere Anteile von T_{naive} und T_{eff} und geringere Anteile von $CD4^+$ und $CD8^+ T_{cm}$, als auch aktivierten/proliferierenden und β -Integrin/CD29 coexprimierenden T-Zellen aufwiesen.

Ungenügende Stimulation, aber auch eine Reihe von ‚Immunescape‘-Mechanismen seitens der leukämischen Zellen können zu einer insuffizienten T-Zell-Antwort führen, welche von Immuntoleranz und T-Zell Anergie geprägt ist (Narita et al., 2001; Westers et al., 2006).

Unsere Ergebnisse stimmen mit früheren Erkenntnissen überein und könnten als Resultat andauernder insuffizienter Stimulation der T-Zellen in den AML Patienten gedeutet werden. Möglicherweise hat die andauernde Präsenz der residuellen leukämischen Zellen zur Generierung ineffektiver Effektor T-Zellen geführt. Des Weiteren könnten die erhöhten Anteile von T_{naive} und die reduzierten Anteile an aktivierten T-Zellen einen weiteren Hinweis auf eine insuffiziente T-Zell Stimulation bzw. Anergie im Rahmen einer antileukämischen Reaktion geben.

5.4 Die Stimulation von T-Zellen von AML Patienten mit ‘MNC’ oder ‘DC’ erhöht die Anteile von aktivierten T-Zellen mit Effektorfunktion

Wir und andere konnten bereits zeigen, dass eine Leukämie-bedingte T-Zell-Anergie durch die Stimulation durch ‘MNC’ und insbesondere durch ‘DC’ durchbrochen werden kann (Grabrucker et al., 2010; Kremser et al., 2010; Narita et al., 2001; Schmetzer, 2011; Westers et al., 2006). Unsere Daten zeigen, dass die T-Zell-Profile von AML- und gesunden Probanden im Anschluss an die Stimulation mit ‘DC’ als auch ‘MNC’ eine Änderung hingehend zu einem Profil geprägt von Zellen mit Effektorfunktion zeigten. Wie vor Stimulation zeigten Proben von AML Patienten geringere Anteile von T_{cm} , oder Aktivierungsmarker- und β -Integrinexprimierenden T-Zellen; aber einen höheren Anteil von T_{eff} .

Das könnte bedeuten, dass AML-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden höhere Anteile von (dysfunktionalen) T_{naive} und T_{eff} und in Konsequenz kleineren Anteilen von T_{cm} entwickeln. Diese Ergebnisse könnte man im Sinne einer reaktiven Überproduktion von funktionslosen T_{eff} auf Grund einer permanenten Konfrontation mit leukämischen Antigenen interpretieren.

Auf der anderen Seite spricht die geringe Anzahl an T_{cm} für eine gestörte Generation von T_{cm} oder Gedächtniszellen im Allgemeinen. Die Wichtigkeit von Gedächtniszellen für das Immunsystem und die Immunantwort ist unbestritten (Roberts, Ely, and Woodland, 2005). Spranger et al. konnten zeigen, dass $CD8^+T_{em}$ zu einer gesteigerten Zytokinexpression und dadurch zu einer verbesserten Bekämpfung von Tumorzellen im Körper beitragen (Spranger et al., 2012), Klebanoff et al. konnten zeigen, dass T_{cm} eine wichtige Rolle (wichtiger als T_{em}) in der adaptiven Immuntherapie einnehmen (Klebanoff et al., 2005). Ausgehend von unseren Daten und Daten der Literatur ist es denkbar, dass die gestörte Generation von T_{cm} in AML-Patienten eine Ursache in der Genese von Tumor-Escape und dem Ausbruch bzw. Rückfall der Erkrankung darstellt.

Der Grad der T-Zell-Aktivierung lässt sich an Hand einiger Oberflächenmarker messen, welche im Anschluss an eine T-Zell Stimulation hochreguliert werden. CD69 und CD71 haben sich als brauchbare T-Zell Aktivierungsmarker bewährt, da sie nicht konstitutiv auf ruhenden T-Zellen exprimiert werden und im Anschluss an eine Stimulation einen Anstieg der Expression aufweisen (Starska et al., 2011). CD28, CD137 und CD154 sind ebenfalls T-Zell-Oberflächenmarker, welche in Kontakt mit APC stehen und co-stimulatorische Signale bei der T-Zell-Aktivierung übertragen (Ma and Clark, 2009; Myers and Vella, 2005; Rudd,

Taylor, and Schneider, 2009). Manche Gruppen nutzen CD28 ebenfalls dazu, T_{eff} zu charakterisieren (als $CD28^+CD8^+CD57^+$), da CD28 im Rahmen der Stimulation und Differenzierung von der Oberfläche der T-Zellen verloren geht (Coppo et al., 2012).

Im Allgemeinen zeigten AML Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden geringere Anteile von aktivierten Zellen während der Stimulation mit 'DC' oder 'MNC'. Dieser Unterschied ist möglicherweise durch eine Leukämie-induzierte T-Zell Anergie oder verminderte spezifische antileukämische T-Zell Aktivierung in AML-Patienten zu erklären. Interessanterweise konnten höhere Anteile von aktivierten T-Zellen nach MLR sowohl nach 'MNC' – als auch 'DC'-Stimulation in *AML-Patienten* und *gesunden Probanden* im Vergleich zu den unstimulierten Proben gefunden werden. Die Zunahme von aktivierten T-Zellen in gesunden Proben mag durch die Stimulation durch infektiöse oder inflammatorische Stimuli erklärt werden. Möglicherweise ist die Zugabe von T-Zell-stimulierendem IL-2 in unserem Versuchsaufbau bereits ausreichend für eine Zunahme der $CD69^+$ und $CD71^+$ Zellen. Der einzige Marker, der ausschließlich in AML-Proben eine Zunahme zeigte, war CD154, der Rezeptor für CD40. Houtenbos et al. konnten zeigen, dass 'DC' reichlich CD154 L (=CD 40) exprimieren und dass $\alpha CD40/\alpha CD28$ Diabodies die Proliferation und die Effektivität der Tumor-spezifischen T-Zell-Aktivierung steigern (Houtenbos et al., 2008). Umgekehrt konnten Lee et al. zeigen, dass die Zugabe von CD154 (CD40 L) sich positiv auf die 'DC'-Generierung auswirkt (Lee et al., 2004). Wir vermuten, dass über die CD154-CD40 Bindung eine wechselseitige Verstärkung der T-Zell-'DC'Interaktion ausgelöst wird, ohne eine notwendige Bedingung für die T-Zell Aktivierung darzustellen, diese jedoch verstärken kann. CD28 und CD137 erwiesen sich in unseren Versuchen als wenig brauchbar- zumindest in dem von uns zeitlich erfassten Fenster-, da sie nahezu konstant exprimiert wurden und im Falle von CD28 sogar eine leichte Abnahme im Verlauf der Zeit zu verzeichnen war. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass CD69 und CD71 sich als generelle Proliferationsmarkern in Gesunden und bei AML-Patienten bewährt haben, was bereits in vorrausgehenden Arbeiten beschrieben wurde, (Grabrucker et al., 2010; Kremser et al., 2010; Liepert et al., 2010) und dass CD154 ein vielversprechender 'DC'-spezifischer Aktivierungsmarker im Rahmen von 'DC'-Stimulation in AML ist.

5.5 Geringere Anteile an β -Integrin-exprimierenden T-Zellen nach Stimulation als spezifischer Marker für eine antileukämische T-Zell Aktivierung?

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Anteil von β -Integrin⁺ T-Zellen der AML Patienten durch Stimulation abnahm, wohingegen gesunde Probanden konstante Werte offenbarten. Nach

Stimulation fanden wir signifikant geringere Proportionen von CD29⁺ T-Zellen in AML-Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden. Dieser Sachverhalt lässt sich anhand unserer Daten nicht vollständig erklären, es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass die Anwesenheit der leukämischen Blasten eine Rolle spielt. Möglicherweise ist die Anwesenheit eines Antigens wichtig für die Veränderungen der β -Integrine. Man weiß, dass CD29 in die Migration von Leukozyten ins Knochenmark oder in entzündetes Gewebe involviert ist, wohingegen β 7-Integrin eine Rolle beim Emigrieren der T-Zellen in lymphatisches Gewebe des Gastrointestinalen Systems eine Rolle spielt (Kang et al., 2011). Vermeulen et al. konnten frühere Vermutungen bestätigen, die besagen, dass CD29 für das ‚Knochenmark-homing‘ von Stammzellen von Bedeutung ist (Vermeulen et al., 1998). DeNucci et al. fanden heraus, dass T_{cm}, welche kein CD29 exprimierten, die Fähigkeit verlieren sich an Stroma-Zellen im KM zu binden, ihre Adhäsion aufzulösen und vom KM ins periphere Blut zu emigrieren (DeNucci and Shimizu, 2011). β -Integrine erfüllen somit wichtige Funktionen in der T-Zell Migration und Stimulation (Elices et al., 1990; Gorfu, Rivera-Nieves, and Ley, 2009; Hamann et al., 1994; Kamiguchi et al., 1999; Shaw and Brenner, 1995). Das geringere Vorkommen von β -Integrin⁺ T-Zellen in AML-Patienten könnte mit einer veränderten Stimulation und Migration der T-Zellen von AML-Patienten einhergehen. Möglicherweise sind die β -Integrine auf T-Zellen genauso anzusehen wie andere co-stimulatorische Oberflächenmoleküle, zum Beispiel CD28, welche während der Stimulation herunterreguliert werden. Alternativ könnten β -Integrine als eine Art „Anker“ betrachtet werden, welcher für den Antigenkontakt verwendet wird und nach Stimulation verloren geht. Somit wäre es möglich, dass ein geringer Anteil an β -Integrin-exprimierender T-Zellen nach Stimulation ein spezifischer Marker für eine antileukämische T-Zell Aktivierung ist.

5.6 Entwicklung der T-Zell-Subtypen während der Stimulation

Was die Entwicklung der T-Zellen während der Stimulation angeht konnten wir die Daten der Literatur bestätigen: ‘MNC’- und insbesondere ‘DC’ stimulierte T-Zellen von AML-Patienten als auch von gesunden Probanden zeigten eine Zunahme der Anteile von T-Effektor- und -Gedächtniszellen sowie eine Abnahme der naiven T-Zellen. Sallusto und Kollegen beschrieben bereits eine Änderung des T-Zellprofils hingehend zu Zellen mit Effektorfunktion in Folge einer Stimulation (Berger et al., 2008; Klebanoff et al., 2005; Sallusto, Geginat, and Lanzavecchia, 2004). Der Literatur zu Folge ist die Immunantwort in 4 Phasen unterteilt: die Induktions-, Expansions-, Kontraktions- und Gedächtnisphase. In Virus-spezifischen Immunreaktionen ist der maximale Level der Proliferation und Differenzierung

am Ende der Expansionsphase nach 8 Tagen post Infektionem erreicht (Whitmire, 2011; Whitmire et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass bereits nach 5 Tagen Stimulation stabile Verhältnisse mit dem Höhepunkt an Effektor-T-Zellen erreicht wurde. Wir nehmen an, dass die antigenspezifische, zielgerichtete Aktivierung der T-Zellen durch ‘DC’ aber auch durch ‘MNC’ die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen beschleunigt haben könnte. Alternativ könnte das Vorkommen bereits vorhandener T_{cm} in der T-Zell Suspension, welche im Vergleich zu T_{naive} zu einer schnelleren und stärkeren (sekundären) Immunantwort in der Lage sind (Roberts, Ely, and Woodland, 2005), unsere Ergebnisse erklären. Die Bildung des T-Zell-Gedächtnisses ist nach wie vor noch nicht komplett verstanden. Es konnte gezeigt werden, dass T-Zellen nach Stimulation von T_{naive} zu T_{cm} und weiter zu T_{em} und T_{eff} in Abhängigkeit der Dauer und Stärke des Stimulus differenzieren (Klebanoff, Gattinoni, and Restifo, 2006). Diese T-Zell-Subtypen können anhand ihres typischen Expressionsmuster an ihrer Oberfläche, der Telomerenlänge, der Sekretion von Zytokinen und Perforinen gemessen und quantifiziert werden (Klebanoff, Gattinoni, and Restifo, 2006; MacLeod et al., 2011; Reinhardt et al., 2001; Sallusto et al., 1999). Andere Forscher proklamierten, dass ein kleiner Teil der T_{eff} nach der Immunantwort nicht in der Apoptose zu Grunde geht, sondern zu T_{cm} differenzieren und als solche das T-Zellgedächtnis bilden (Gerlach, van Heijst, and Schumacher, 2011; Wherry et al., 2003). Da wir einen kleinen Anstieg an T_{cm} an Tag 1 messen konnten sind wir eher dazu geneigt zu vermuten, dass T_{naive} direkt zu T_{cm} und nicht erst zu Effektorzellen differenzieren, auch wenn unser Versuchssetting nicht ausreichend ist um dies zu beweisen.

5.7 Die antileukämische Funktionalität korreliert mit den T-Zell-Subtypen.

Unsere Resultate bestätigen frühere Ergebnisse von uns, dass *ex-vivo* stimulierte T-Zellen antileukämische Funktionalität erlangen und dass ‘DC’-stimulierte T-Zellen in Lysetests besser abschneiden als ‘MNC’-stimulierte oder unstimulierte T-Zellen (Grabrucker et al., 2010; Kremser et al., 2010). 64% der Fälle nach ‘DC’-Stimulation erlangten antileukämische Funktionalität im Vergleich zu 40% nach ‘MNC’-Stimulation. Wir vermuten, dass dieser Unterschied durch die Eigenschaften von ‘DC’ erklärt werden kann, welche sowohl das gesamte Repertoire an leukämischen Antigenen als auch suffizient co-stimulatorische Signale für die T-Zell-Stimulation auf sich vereinen (Westers et al., 2006). Interessanterweise konnten auf den ersten Blick keine signifikanten Unterschiede nach ‘DC’ und ‘MNC’ –Stimulation aufgezeigt werden.

Es zeigte sich jedoch, dass die 'DC'-Stimulation die antileukämische Funktionalität verbessert und mit einem veränderten T-Zell-Profil, verglichen mit Fällen ohne antileukämische Funktionalität, einhergeht. Durch unsere Versuche konnten wir ein Muster von T-Zell-Zusammensetzungen identifizieren, welches mit antileukämischer Aktivität einhergeht. Fälle mit antileukämischer Aktivität hatten hohe Anteile von CD4⁺/CD8⁺ T_{naive}, CD4⁺/CD8⁺ T_{cm} und geringe Anteile an CD4⁺/CD8⁺ T_{em} bzw. T_{eff} vor Stimulation. Das bedeutet, dass Fälle mit hohen Anteilen an T-Zellen mit geringer Differenzierung vor Stimulation bessere Immunreaktionen zeigten: T_{naive} und T_{cm} sind T-Zellen mit hohem Stimulations- und Proliferationspotenzial, welche zu T-Zellen mit Effektorfunktion differenzieren (Sallusto, Geginat, and Lanzavecchia, 2004). Im Gegensatz dazu versagten die Fälle mit hohen Anteilen an T_{eff} vor Stimulation häufiger im Lysetest.

Jedoch nicht nur die Anteile der T_{cm} vor 'DC'-Stimulation, sondern auch nach Stimulation scheinen von Bedeutung für die Effizienz einer Immunreaktion zu sein. Unsere Cut-off Werte zeigen, dass höhere Anteile von T_{cm} nach Stimulation mit einer guten antileukämischen Funktionalität einhergingen. Da T_{cm} durch das Fehlen von Effektorfunktionen definiert werden (Masopust et al., 2001; Sallusto, Geginat, and Lanzavecchia, 2004; Sallusto et al., 1999) ist nicht klar wie T_{cm} die Immunreaktion nach Stimulation beeinflussen. Es ist bekannt, dass CD8⁺ Gedächtniszellen eine vermehrte Ausschüttung von IL-12 seitens DC fördern, was zur Bildung von Th1 und weiteren CTL führt. Des Weiteren bewahren CD8⁺T_{mem} DC vor Apoptose-Induktion durch CTL (Watchmaker et al., 2008). Möglicherweise ist das im Vergleich vermehrte Vorkommen von T_{cm} in der Lysegruppe ein Zeichen von erfolgreicher T_{cm}-Generierung, welches mit einer erfolgreichen Blastenbekämpfung korreliert. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass Patienten ohne suffiziente Immunantwort unfähig sind T_{cm} zu produzieren. Demnach könnten T_{cm} als prädiktive Marker in einem immuntherapeutischen Setting eingesetzt werden.

Neben T_{cm} sind T_{eff} die hauptverantwortlichen Zellen einer Immunantwort. In unserem Lyse-Test gingen hohe Anteile von T_{eff} nach 'DC'-Stimulation mit guter antileukämischer Funktionalität einher. Jedoch zeigten sich Hinweise, dass nicht einzig die Quantität über den klinischen Verlauf entscheidet, sondern auch die Qualität der T_{eff}. Wir konnten sehen, dass AML-Patienten höhere (möglicherweise anerge) Anteile an T_{eff} vor Stimulation im Vergleich zu gesunden Probanden aufwiesen, was durch den permanenten Kontakt mit leukämischen Zellen in vivo erklärt werden könnte. Dies zeigt jedoch, dass die Quantität der T-Zellen alleine nicht der Schlüssel für eine erfolgreiche Immunantwort ist. Im Gegensatz zu unseren

Beobachtungen nach 'DC'-Stimulation zeigten Patienten mit geringeren Anteilen an T_{eff} vor Stimulation besser Ergebnisse im Lyse Test. Es ist möglich dass die Patienten, die hohe Anteile an T_{eff} und geringe Anteile an T_{cm}/T_{naive} vor Stimulation haben, es nicht schaffen eine antileukämische Reaktion auszulösen und funktionelle T_{eff} und T_{cm} zu generieren, da nicht genügend ungeprimte oder nicht ausdifferenzierte T-Zellen für eine 'DC'-Stimulation zur Verfügung stehen. Demnach zeigten die AML-Proben das beste Ergebnis, die die meisten neuen und funktionellsten T_{eff} ausbildeten. Einfach ausgedrückt könnte man sagen, dass diejenigen AML-Patienten die schlechteste Prognose aufwiesen, die bereits in einer Immunreaktion festgefahren waren und über wenig unausgebildete und noch zu stimulierende Zellen wie T_{naive} oder T_{cm} verfügen.

Es zeigte sich ebenso, dass Patienten mit höheren Anteilen an T_{cm} und T_{naive} vor 'DC'-Stimulation bessere Resultate in den *ex-vivo* Lyse-Tests aufwiesen. T_{cm} haben ein hohes Proliferationspotential (Sallusto, Geginat, and Lanzavecchia, 2004; Sallusto et al., 1999), zeigen eine bessere Resistenz gegenüber Apoptose-Mechanismen als andere T-Zellen (Chevalier et al., 2011) und reagieren besonders gut auf 'DC'-Stimulation, auch ohne die gesamte Bandbreite der co-stimulatorischen Signale (Roberts, Ely, and Woodland, 2005; Wherry et al., 2003). Mit ihrer charakteristischen Fähigkeit der 'Selbsterneuerung' (Wherry et al., 2003) können sie als eine Art Background-Pool betrachtet werden, der kontinuierlich „untergegangene“ T_{em} und T_{eff} ersetzt und deren Spiegel in adäquater Höhe hält (Reinhardt et al., 2001). In welchem Maße T_{cm} eine Rolle in akuten Immunreaktionen spielen ist nicht geklärt, auch wenn ihnen eine Relevanz zugeschrieben wird. Untersuchungen von Klebanoff et al. konnten die Überlegenheit von T_{cm} gegenüber T_{em} im Rahmen der adaptiven Immuntherapie zeigen (Klebanoff et al., 2005) und Berger et al. wiesen nach, dass transferierte Klone von T_{cm} im Vergleich zu T_{em} länger im Empfänger überlebten und ein besser funktionierendes Gedächtnis bildeten (Berger et al., 2008). Unsere Ergebnisse unterstützen diese Vermutung und geben weitere Hinweise darauf, dass T_{cm} eine Schlüsselrolle in den vorliegenden Immunreaktionen spielen. Es ist durchaus plausibel, dass die Stimulation von Proben mit höheren Anteilen an T_{cm} bessere Resultate im Lyse-Test zeigen, da diese Zellen eine höhere T-Zell-Proliferation als auch eine T-Zell-Differenzierung zu T_{eff} zeigen und somit eine stärkere Immunantwort ausbilden können. Wir vermuten: Proben mit höheren Anteilen an T_{cm} haben eine größere Wahrscheinlichkeit und ein größeres Potenzial eine größere Menge an funktionierenden T_{eff} auszubilden.

5.8 Der Grad der Aktivierung bei T-Zellen korreliert mit der Funktionalität im Lyse Test

Die antileukämische Funktionalität korreliert eindeutig mit der Höhe der Anteile an aktivierten T-Zellen. Dieser Zusammenhang konnte allerdings nicht an Tag 7 nachgewiesen werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Aktivierungsmarker nur temporär exprimiert und nach 7 Tagen Stimulation herunterreguliert werden und nicht mehr an der T-Zell-Oberfläche nachzuweisen sind. Wenn man allerdings den Verlauf in die Untersuchungen mit einbezieht und Patienten der Lyse-Gruppe mit Patienten der Nicht-Lyse-Gruppe vergleicht zeigen sich starke Korrelationen an den Tagen 1, 3 und 5. Es war zu sehen, dass Patienten mit stärkerer Expression der Aktivierungsmarker während der Stimulationsphase ein besseres Abschneiden im Lyse Test zeigten. Es erscheint logisch, dass Patienten mit höherer Proliferation auch eine bessere Funktionalität erreichen. Insbesondere der Tag 5 eignete sich, um Cut-off Werte herauszuarbeiten, die möglicherweise auch zur Vorhersage antileukämischer Reaktionen nutzbar gemacht werden können. Des Weiteren ist es vorstellbar, dass Aktivierungsmarker dahingehend genutzt werden könnten antileukämisch aktive T-Zellen schon während der Stimulation zu isolieren, aufzureinigen und dann im Rahmen einer DLI zu verabreichen. Hartwig et al. und andere versuchten $CD69^+$, $CD71^+$ und $CD137^+$ T-Zellen von ihrem KM-Transplantat zu entfernen, unter der Annahme, somit den Auslöser der GvHD zu eliminieren bei gleichzeitigem Aufrechterhalten der gewünschten GvL (Hartwig et al., 2006; van Dijk et al., 1999; Wehler et al., 2007). Unsere Daten deuten daraufhin, dass $CD69^+$ und $CD71^+$ T-Zellen als auch $CD28^+$ und $CD137^+$ Zellen verantwortlich für die antileukämische Antwort sind und für diese auch benötigt werden. Es wäre interessant zu sehen ob selektierte $CD69^+$ T-Zellen eine bessere Blasten-Lyse zeigen und ob diese Verbesserung mit einer erhöhten Alloreaktivität erkauft wird.

5.9 Hohe Anteile von β -Integrinen korrelieren mit antileukämischer Funktionalität

Unsere Ergebnisse zeigten, dass hohe Anteile von $CD29^+/\beta 7$ -Integrin⁺ T_{cm} und T_{naive} vor Stimulation mit guter antileukämischer Funktionalität einherging. Da β -Integrine, allen voran CD29, co-stimulatorische Signale vermitteln und eine Schlüsselrolle in der Proliferation und IL-2-Produktion von T-Zellen inne haben (Kamiguchi et al., 1999), kann man sich vorstellen dass das Fehlen von β -Integrinen negative Konsequenzen bezüglich der T-Zell-Stimulation mit sich bringt. Kim et al. konnten zeigen, dass co-stimulatorische Signale via CD29 die T-Zell-Stimulation verstärkt und Kulkin et al. vermuteten, dass $\alpha 4\beta 7$ die Immunantwort im Magen-Darm-Bereich erleichtert (Kuklin et al., 2000). Dies würde erklären, warum lytisch

aktive T-Zellen (welche IL-2 für optimale Proliferation benötigen) höhere Anteile an CD29⁺ T_{naive} aufzeigen. Darüber hinaus zeigten unsere Cutoff-Analysen, dass Proben mit hohen Anteilen an CD29⁺/β7-Integrine⁺ T_{eff} nach ‘DC’-Stimulation eine gute antileukämische Funktionalität im Lysetest zeigten. Daraus folgern wir, dass CD29⁺/β7-Integrine⁺ T_{naive}/T_{cm}, die zu CD29⁺/β7-Integrine⁺ T_{eff} differenzieren, die T_{eff} mit der besten antileukämischen Funktionalität sind. Demnach könnten CD29 und β7-Integrin als Marker für neu generierte T_{eff} mit antileukämischer Funktionalität dienen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

6.1.1 Klinische Relevanz von T-Zell-Subtypen für die Immunotherapie der AML

Wir konnten zeigen, dass die antileukämische Funktionalität von T-Zellen durch das T-Zellprofil von AML-Patienten vor und nach ‘DC’-Stimulation vorhergesagt werden kann. Detailliertere Cut-off-Analysen offenbarten, dass die Zusammensetzung von T-Zell-Subtypen und Aktivierungsmarkern hilfreich für die Vorhersage von antileukämischer Aktivität ist und somit helfen könnte die Immunantwort im Rahmen von Immuntherapien vorherzusagen. In den vorhergehenden Kapiteln konnten wir zeigen, dass Patienten mit höheren Anteilen an T-Zellen mit hoher Proliferationspotenz, wie zum Beispiel T_{cm} und T_{naive} , eher von einer ‘DC’-Stimulation profitieren als Patienten mit höheren Anteilen von (möglicherweise dysfunktionellen) T_{eff} . Das würde bedeuten, dass die Immunsysteme von Patienten, die an einem Rückfall nach Stammzelltransplantation leiden, aber einer adäquaten Menge an T_{cm} bereit halten, durch eine spezifische Stimulation, z.B. durch ‘DC’, reaktiviert werden kann. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass höhere Anteile an T_{cm} und T_{eff} nach der Stimulation mit antileukämischer Funktionalität korreliert und damit als prädiktiver Marker in der Immuntherapie fungieren können. In ähnlicher Art und Weise können CD69, CD71, CD137 und β -Integrine als prädiktiver Marker verwendet werden. Unsere Daten lassen die Vermutung zu, dass sowohl $CD69^+$ und $CD71^+$, als auch $CD137^+$ und β -Integrin $^+$ T-Zellen für die antileukämische Immunantwort verantwortlich sind und deshalb unerlässlich sind. Demzufolge könnten Strategien für die adoptive Immuntherapie abgeleitet werden: ein adoptiver Transfer von T_{cm} oder T_{eff} , wie bereits von Klebanoff et al und Berger et al. vorgeschlagen (Berger et al., 2008; Klebanoff, Gattinoni, and Restifo, 2006; Klebanoff et al., 2005) könnte demnach einen Pool an Zellen mit hohem Proliferationspotenzial und hoher Resistenz gegen Apoptose bereitstellen, welche im Gegensatz zu T_{em} , in der Lage sind ein antileukämisches T-Zell-Gedächtnis aufzubauen ohne eine GvHD zu induzieren. (Chevalier et al., 2011; Sallusto, Geginat, and Lanzavecchia, 2004; Sallusto et al., 1999). Darüber hinaus zeigen unsere Daten, welcher vielversprechender Ansatz die Stimulation mit ‘DC’ Zellen ist, welche als in-vivo induzierte ‘DC’-vermittelte Immunstimulation zu einer spezifischen (Re-)Aktivierung von antileukämischen T-Zellen aus T_{naive} oder T_{cm} führen könnte. Auf diese Weise könnte die T-Zell-basierte Immuntherapie im Rahmen von SZT oder DLI verbessert werden (Roberts, Ely, and Woodland, 2005; Wherry et al., 2003).

6.1.2 Zusammenfassung:

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sich die T-Zell-Profile von AML-Patienten im Vergleich zu T-Zell-Profilen von gesunden Probanden unterscheiden. Wir nehmen an, dass diese Unterschiede der permanenten Konfrontation und Stimulation der T-Zellen durch residuelle leukämische Zellen geschuldet sind und eine inadäquate Immunantwort auf die AML widerspiegelt. Darüber hinaus konnten unsere Daten zeigen, dass dieser anerge Zustand durch eine ‘DC’-basierte Stimulation von T-Zellen überwunden werden kann und antileukämisch funktionelle T-Zellen generiert werden können. Insbesondere Proben mit hohen Anteilen an Zellen mit hohem Proliferationspotenzial wie T_{cm} und T_{naive} , als auch β -Integrin⁺ T-Zellen zeigten eine gute antileukämische Funktionalität in unseren Tests. Dies könnte bedeuten, dass das Immunsystem von Patienten, welche einen Rückfall nach einer SZT erleiden, jedoch eine adäquat hohe Anzahl an T_{cm} bereit halten, durch Stimulation mit ‘DC’ in vivo oder in vitro wieder reaktiviert werden könnten. Im Weiteren konnten wir zeigen, dass die Funktionalität der T-Zellen mit einem bestimmten Profil der T-Zellen und T-Zell-Oberflächenmarkern vor und nach Stimulation korreliert. Die oben genannten Aktivierungsmarker und β -Integrine könnten als prädiktive Marker für das Monitoring der reaktiven Potenziale der T-Zellen und ihrer Subtypen im Verlauf der Immunreaktion dienen. Hohe Anteile von Aktivierungsmarkern und β -Integrinen gingen mit guter antileukämischer Reaktion im Lyse-Test einher. Wir konnten zeigen, dass Aktivierungsmarker als prädiktive Marker in Immuntherapien eingesetzt werden können. Es ist sogar denkbar, dass an Hand dieser Marker antileukämische T-Zellen isoliert und in höherer Konzentration den Patienten verabreicht werden könnten oder dass die von uns getesteten Aktivierungsmarker und β -Integrine als „Target“ für adjuvante Substanzen verwendet werden können, welche die T-Zell Antwort verstärken. Wir glauben, dass T_{cm} dabei am besten mit APC interagieren. Somit könnte auch hier eine aufgereinigte T-Zellspende mit hohen Anteilen an T_{cm} eine DLI verbessern. In diesem Zusammenhang sind allerdings noch weitere Untersuchungen bezüglich der exakten co-stimulatorischen Pathways in diesem Setting von Nöten.

7. Literatur

- Aisen, P. (2004). Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* **36**(11), 2137-43.
- Arber, D. A. (2001). Realistic pathologic classification of acute myeloid leukemias. *Am J Clin Pathol* **115**(4), 552-60.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* **103**(4), 620-5.
- Bensinger, W. I., Martin, P. J., Storer, B., Clift, R., Forman, S. J., Negrin, R., Kashyap, A., Flowers, M. E., Lilleby, K., Chauncey, T. R., Storb, R., and Appelbaum, F. R. (2001). Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med* **344**(3), 175-81.
- Berger, C., Jensen, M. C., Lansdorp, P. M., Gough, M., Elliott, C., and Riddell, S. R. (2008). Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* **118**(1), 294-305.
- Boesteanu, A. C., and Katsikis, P. D. (2009). Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Semin Immunol* **21**(2), 69-77.
- Burnett, A., Wetzler, M., and Lowenberg, B. (2011). Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **29**(5), 487-94.
- Cario, G., Rhein, P., Mitlohner, R., Zimmermann, M., Bandapalli, O. R., Romey, R., Moericke, A., Ludwig, W. D., Ratei, R., Muckenthaler, M. U., Kulozik, A. E., Schrappe, M., Stanulla, M., and Karawajew, L. (2014). High CD45 surface expression determines relapse risk in children with precursor B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica* **99**(1), 103-10.
- Chevalier, N., Jarrossay, D., Ho, E., Avery, D. T., Ma, C. S., Yu, D., Sallusto, F., Tangye, S. G., and Mackay, C. R. (2011). CXCR5 expressing human central memory CD4 T cells and their relevance for humoral immune responses. *J Immunol* **186**(10), 5556-68.
- Coppo, P., Buffet, M., Feger, F., and Lassoued, K. (2012). [Polyclonal CD8(+)/CD57(+) T cell expansions: Clinical significance.]. *Presse Med.*
- Crawford, A., and Wherry, E. J. (2009). The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses. *Curr Opin Immunol* **21**(2), 179-86.
- Creutzig, U., and Reinhardt, D. (2006). Akute myeloische Leukämien. 1 ed. In "Pädiatrische Hämatologie und Onkologie" (G. H., G. G., N. C., and R. J., Eds.), pp. 690-714. Springer Verlag, Berlin.
- Denoeud, J., and Moser, M. (2011). Role of CD27/CD70 pathway of activation in immunity and tolerance. *J Leukoc Biol* **89**(2), 195-203.
- DeNucci, C. C., and Shimizu, Y. (2011). beta1 integrin is critical for the maintenance of antigen-specific CD4 T cells in the bone marrow but not long-term immunological memory. *J Immunol* **186**(7), 4019-26.
- DiNardo, C. D., and Luger, S. M. (2012). Beyond morphology: minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* **19**(2), 82-8.
- Dohner, H., Estey, E. H., Amadori, S., Appelbaum, F. R., Buchner, T., Burnett, A. K., Dombret, H., Fenau, P., Grimwade, D., Larson, R. A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G. J., Sanz, M. A., Sierra, J., Tallman, M. S., Lowenberg, B., and Bloomfield, C. D. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**(3), 453-74.
- Duncan, C., and Roddie, H. (2008). Dendritic cell vaccines in acute leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**(3), 521-41.

- Elices, M. J., Osborn, L., Takada, Y., Crouse, C., Luhowskyj, S., Hemler, M. E., and Lobb, R. R. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **60**(4), 577-84.
- Fallen, P. R., Duarte, R. F., McGreavey, L., Potter, M., Ethell, M., Prentice, H. G., Madrigal, J. A., and Travers, P. J. (2003). Identification of non-naïve CD4+CD45RA+ T cell subsets in adult allogeneic haematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* **32**(6), 609-16.
- Fernandez, H. F. (2010). New trends in the standard of care for initial therapy of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2010**, 56-61.
- Ferrara, J. L., Levine, J. E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). Graft-versus-host disease. *Lancet* **373**(9674), 1550-61.
- Gerlach, C., van Heijst, J. W., and Schumacher, T. N. (2011). The descent of memory T cells. *Ann N Y Acad Sci* **1217**, 139-53.
- Giles, F. J., Keating, A., Goldstone, A. H., Avivi, I., Willman, C. L., and Kantarjian, H. M. (2002). Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 73-110.
- Gorfu, G., Rivera-Nieves, J., and Ley, K. (2009). Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med* **9**(7), 836-50.
- Grabrucker, C., Liepert, A., Dreyig, J., Kremser, A., Kroell, T., Freudenreich, M., Schmid, C., Schweiger, C., Tischer, J., Kolb, H. J., and Schmetzer, H. (2010). The quality and quantity of leukemia-derived dendritic cells from patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome are a predictive factor for the lytic potential of dendritic cells-primed leukemia-specific T cells. *J Immunother* **33**(5), 523-37.
- Haferlach, T., Schoch, C., Löffler, H., Gassmann, W., Kern, W., Schnittger, S., Fonatsch, C., Ludwig, W. D., Wuchter, C., Schlegelberger, B., Staib, P., Reichle, A., Kubica, U., Eimermacher, H., Balleisen, L., Gruneisen, A., Haase, D., Aul, C., Karow, J., Lengfelder, E., Wormann, B., Heinecke, A., Sauerland, M. C., Buchner, T., and Hiddemann, W. (2003). Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. *J Clin Oncol* **21**(2), 256-65.
- Hamann, A., Andrew, D. P., Jablonski-Westrich, D., Holzmann, B., and Butcher, E. C. (1994). Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol* **152**(7), 3282-93.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A., and Bloomfield, C. D. (2000). The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology* **36**(1), 69-86.
- Harris, N. L., Watt, V., Ronchese, F., and Le Gros, G. (2002). Differential T cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues. *J Exp Med* **195**(3), 317-26.
- Hartwig, U. F., Nonn, M., Khan, S., Meyer, R. G., Huber, C., and Herr, W. (2006). Depletion of alloreactive T cells via CD69: implications on antiviral, antileukemic and immunoregulatory T lymphocytes. *Bone Marrow Transplant* **37**(3), 297-305.
- Hayhoe, F. G. (1988). Classification of acute leukaemias. *Blood Rev* **2**(3), 186-93.
- Hengel, R. L., Thaker, V., Pavlick, M. V., Metcalf, J. A., Dennis, G., Jr., Yang, J., Lempicki, R. A., Sereti, I., and Lane, H. C. (2003). Cutting edge: L-selectin (CD62L) expression distinguishes small resting memory CD4+ T cells that preferentially respond to recall antigen. *J Immunol* **170**(1), 28-32.
- Hengeveld, M., Suci, S., Karrasch, M., Specchia, G., Marie, J. P., Muus, P., Petti, M. C., Rotoli, B., Amadori, S., Fioritoni, G., Leoni, P., Morra, E., Thaler, J., Resegotti, L., Fazi, P., Vignetti, M., Mandelli, F., Zittoun, R., and de Witte, T. (2012). Intensive consolidation therapy compared with standard consolidation and maintenance therapy for adults with acute myeloid leukaemia aged between 46 and 60 years: final results of the randomized phase III study (AML 8B) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and

- the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *Ann Hematol* **91**(6), 825-35.
- Houtenbos, I., Santegoets, S., Westers, T. M., Waisfisz, Q., Kipriyanov, S., Denkers, F., Scheper, R. J., de Gruijl, T. D., Ossenkoppele, G. J., and van de Loosdrecht, A. A. (2008). The novel bispecific diabody alphaCD40/alphaCD28 strengthens leukaemic dendritic cell-induced T-cell reactivity. *Br J Haematol* **142**(2), 273-83.
- Houtenbos, I., Westers, T. M., Dijkhuis, A., de Gruijl, T. D., Ossenkoppele, G. J., and van de Loosdrecht, A. A. (2007). Leukemia-specific T-cell reactivity induced by leukemic dendritic cells is augmented by 4-1BB targeting. *Clin Cancer Res* **13**(1), 307-15.
- Houtenbos, I., Westers, T. M., Stam, A. G., de Gruijl, T. D., Scheper, R. J., Ossenkoppele, G. J., and van de Loosdrecht, A. A. (2003). Serum-free generation of antigen presenting cells from acute myeloid leukaemic blasts for active specific immunisation. *Cancer Immunol Immunother* **52**(7), 455-62.
- Ibana, J. A., Myers, L., Porretta, C., Lewis, M., Taylor, S. N., Martin, D. H., and Quayle, A. J. (2012). The major CD8 T cell effector memory subset in the normal and Chlamydia trachomatis-infected human endocervix is low in perforin. *BMC Immunol* **13**, 66.
- Jabbour, E. J., Estey, E., and Kantarjian, H. M. (2006). Adult acute myeloid leukemia. *Mayo Clin Proc* **81**(2), 247-60.
- Kamiguchi, K., Tachibana, K., Iwata, S., Ohashi, Y., and Morimoto, C. (1999). Cas-L is required for beta 1 integrin-mediated costimulation in human T cells. *J Immunol* **163**(2), 563-8.
- Kang, S. G., Park, J., Cho, J. Y., Ulrich, B., and Kim, C. H. (2011). Complementary roles of retinoic acid and TGF-beta1 in coordinated expression of mucosal integrins by T cells. *Mucosal Immunol* **4**(1), 66-82.
- Klebanoff, C. A., Gattinoni, L., and Restifo, N. P. (2006). CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* **211**, 214-24.
- Klebanoff, C. A., Gattinoni, L., Torabi-Parizi, P., Kerstann, K., Cardones, A. R., Finkelstein, S. E., Palmer, D. C., Antony, P. A., Hwang, S. T., Rosenberg, S. A., Waldmann, T. A., and Restifo, N. P. (2005). Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(27), 9571-6.
- Kolb, H. J. (2008). Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* **112**(12), 4371-83.
- Kolb, H. J., Simoes, B., and Schmid, C. (2009). Stem cell transplants for patients with relapsed/refractory leukaemia. *Curr Opin Hematol* **16**(6), 444-52.
- Koreth, J., Schlenk, R., Kopecky, K. J., Honda, S., Sierra, J., Djulbegovic, B. J., Wadleigh, M., DeAngelo, D. J., Stone, R. M., Sakamaki, H., Appelbaum, F. R., Dohner, H., Antin, J. H., Soiffer, R. J., and Cutler, C. (2009). Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *JAMA* **301**(22), 2349-61.
- Kremser, A., Dressig, J., Grabrucker, C., Liepert, A., Kroell, T., Scholl, N., Schmid, C., Tischer, J., Kufner, S., Salih, H., Kolb, H. J., and Schmetzer, H. (2010). Dendritic cells (DCs) can be successfully generated from leukemic blasts in individual patients with AML or MDS: an evaluation of different methods. *J Immunother* **33**(2), 185-99.
- Kriener, S., Fend, F., and Hansmann, M.-L. (2008). Akute myeloische Leukämie. 4 ed. In "Pathologie" (W. Böcker, H. Denk, P. U. Heitz, and H. Moch, Eds.), pp. 546-549. Elsevier Urban&Fischer, München.
- Kruger, K., and Mooren, F. C. (2007). T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev* **13**, 37-54.
- Kuhnl, A., and Grimwade, D. (2012). Molecular markers in acute myeloid leukaemia. *Int J Hematol* **96**(2), 153-63.
- Kuklin, N. A., Rott, L., Darling, J., Campbell, J. J., Franco, M., Feng, N., Muller, W., Wagner, N., Altman, J., Butcher, E. C., and Greenberg, H. B. (2000). alpha(4)beta(7) independent pathway for CD8(+) T cell-mediated intestinal immunity to rotavirus. *J Clin Invest* **106**(12), 1541-52.

- Langstein, J., Michel, J., and Schwarz, H. (1999). CD137 induces proliferation and endomitosis in monocytes. *Blood* **94**(9), 3161-8.
- Larson, R. A. (2007). Etiology and management of therapy-related myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 453-9.
- Lee, A. W., Truong, T., Bickham, K., Fonteneau, J. F., Larsson, M., Da Silva, I., Somersan, S., Thomas, E. K., and Bhardwaj, N. (2002). A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* **20 Suppl 4**, A8-A22.
- Lee, J. J., Choi, B. H., Nam, J. H., Park, M. S., Song, W. H., Yang, D. H., Kim, Y. K., Cho, S. H., Chung, I. J., Park, K. S., Lee, I. K., and Kim, H. J. (2004). The generation of leukemic dendritic cells from acute myeloid leukemia cells is potentiated by the addition of CD40L at the terminal maturation stage. *J Clin Apher* **19**(3), 130-6.
- Li, L., Giannopoulos, K., Reinhardt, P., Tabarkiewicz, J., Schmitt, A., Greiner, J., Rolinski, J., Hus, I., Dmoszynska, A., Wiesneth, M., and Schmitt, M. (2006). Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts. *Int J Oncol* **28**(4), 855-61.
- Licht, J. D., and Sternberg, D. W. (2005). The molecular pathology of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 137-42.
- Liepert, A., Grabrucker, C., Kremser, A., Dreyssig, J., Ansprenger, C., Freudenreich, M., Kroell, T., Reibke, R., Tischer, J., Schweiger, C., Schmid, C., Kolb, H. J., and Schmetzer, H. (2010). Quality of T-cells after stimulation with leukemia-derived dendritic cells (DC) from patients with acute myeloid leukemia (AML) or myeloid dysplastic syndrome (MDS) is predictive for their leukemia cytotoxic potential. *Cell Immunol* **265**(1), 23-30.
- Lio, D., Candore, G., Cigna, D., D'Anna, C., Di Lorenzo, G., Giordano, C., Lucania, G., Mansueto, P., Melluso, M., Modica, M. A., and Caruso, C. (1996). In vitro T cell activation in elderly individuals: failure in CD69 and CD71 expression. *Mech Ageing Dev* **89**(1), 51-8.
- Luck, A. N., and Mason, A. B. (2012). Transferrin-mediated cellular iron delivery. *Curr Top Membr* **69**, 3-35.
- Ma, D. Y., and Clark, E. A. (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol* **21**(5), 265-72.
- MacLeod, M. K., David, A., McKee, A. S., Crawford, F., Kappler, J. W., and Marrack, P. (2011). Memory CD4 T cells that express CXCR5 provide accelerated help to B cells. *J Immunol* **186**(5), 2889-96.
- Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M. A., Hieshima, K., Springer, T. A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., and von Andrian, U. H. (2001). Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* **108**(6), 871-8.
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L., and Lefrancois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* **291**(5512), 2413-7.
- Miyazaki, T., Fujita, H., Fujimaki, K., Hosoyama, T., Watanabe, R., Tachibana, T., Fujita, A., Matsumoto, K., Tanaka, M., Koharazawa, H., Taguchi, J., Tomita, N., Sakai, R., Fujisawa, S., Kanamori, H., and Ishigatsubo, Y. (2012). Clinical significance of minimal residual disease detected by multidimensional flow cytometry: serial monitoring after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Leuk Res* **36**(8), 998-1003.
- Molero, T., Roemer, B., Perera Alvarez Mdel, M., Lemes, A., Inigo Sde, L., Palacios, G., and Scott, C. S. (2005). Analysis and enumeration of T cells, B cells and NK cells using the monoclonal antibody fluorescence capability of a routine haematology analyser (Cell-Dyn CD4000). *Clin Lab Haematol* **27**(4), 224-34.
- Myers, L. M., and Vella, A. T. (2005). Interfacing T-cell effector and regulatory function through CD137 (4-1BB) co-stimulation. *Trends Immunol* **26**(8), 440-6.
- Narita, M., Takahashi, M., Liu, A., Nikkuni, K., Furukawa, T., Toba, K., Koyama, S., Takai, K., Sanada, M., and Aizawa, Y. (2001). Leukemia blast-induced T-cell anergy demonstrated by leukemia-derived dendritic cells in acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* **29**(6), 709-19.

- Nguyen, X. D., Eichler, H., Dugrillon, A., Piechaczek, C., Braun, M., and Kluter, H. (2003). Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells. *J Immunol Methods* **275**(1-2), 57-68.
- Noor, S., and Wilson, E. H. (2012). Role of C-C chemokine receptor type 7 and its ligands during neuroinflammation. *J Neuroinflammation* **9**, 77.
- Prezzemolo, T., Guggino, G., La Manna, M. P., Di Liberto, D., Dieli, F., and Caccamo, N. (2014). Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol* **5**, 180.
- Redmond, W. L., Ruby, C. E., and Weinberg, A. D. (2009). The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Crit Rev Immunol* **29**(3), 187-201.
- Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M. K. (2001). Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* **410**(6824), 101-5.
- Roberts, A. D., Ely, K. H., and Woodland, D. L. (2005). Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J Exp Med* **202**(1), 123-33.
- Roddie, H., Klammer, M., Thomas, C., Thomson, R., Atkinson, A., Sproul, A., Waterfall, M., Samuel, K., Yin, J., Johnson, P., and Turner, M. (2006). Phase I/II study of vaccination with dendritic-like leukaemia cells for the immunotherapy of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **133**(2), 152-7.
- Rudd, C. E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* **229**(1), 12-26.
- Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**, 745-63.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2011). Memory in disguise. *Nat Med* **17**(10), 1182-3.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**(6754), 708-12.
- Sancho, D., Gomez, M., and Sanchez-Madrid, F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* **26**(3), 136-40.
- Sato, M., Takayama, T., Tanaka, H., Konishi, J., Suzuki, T., Kaiga, T., and Tahara, H. (2003). Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E(2). *Cancer Sci* **94**(12), 1091-8.
- Schmetzer, H. M. (2011). Antileukemic T-cell-mediated immune reactions: limitations and perspectives for future therapies. *Immunotherapy* **3**(7), 809-11.
- Schmetzer, H. M., Kremser, A., Loibl, J., Kroell, T., and Kolb, H. J. (2007). Quantification of ex vivo generated dendritic cells (DC) and leukemia-derived DC contributes to estimate the quality of DC, to detect optimal DC-generating methods or to optimize DC-mediated T-cell-activation-procedures ex vivo or in vivo. *Leukemia* **21**(6), 1338-41.
- Schmid, C., Labopin, M., Nagler, A., Bornhauser, M., Finke, J., Fassas, A., Volin, L., Gurman, G., Maertens, J., Bordigoni, P., Holler, E., Ehninger, G., Polge, E., Gorin, N. C., Kolb, H. J., and Rocha, V. (2007). Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol* **25**(31), 4938-45.
- Schmid, C., Labopin, M., Nagler, A., Niederwieser, D., Castagna, L., Tabrizi, R., Stadler, M., Kuball, J., Cornelissen, J., Vorlicek, J., Socie, G., Falda, M., Vindelov, L., Ljungman, P., Jackson, G., Kroger, N., Rank, A., Polge, E., Rocha, V., and Mohty, M. (2012a). Treatment, risk factors, and outcome of adults with relapsed AML after reduced intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **119**(6), 1599-606.
- Schmid, C., Schleuning, M., Tischer, J., Holler, E., Haude, K. H., Braess, J., Haferlach, C., Baurmann, H., Oruzio, D., Hahn, J., Spiekermann, K., Schlimok, G., Schwerdtfeger, R., Buechner, T., Hiddemann, W., and Kolb, H. J. (2012b). Early allo-SCT for AML with a complex aberrant karyotype--results from a prospective pilot study. *Bone Marrow Transplant* **47**(1), 46-53.

- Scholl, N., Loibl, J., Kremser, A., Liepert, A., Grabrucker, C., Salih, H. R., Kolb, H. J., and Schmetzer, H. M. (2009). The role of soluble and cell-surface expressed 4-1BB ligand in patients with malignant hemopoietic disorders. *Leuk Lymphoma* **50**(3), 427-36.
- Schuster, F. R., Buhmann, R., Reuther, S., Hubner, B., Grabrucker, C., Liepert, A., Reibke, R., Lichtner, P., Yang, T., Kroell, T., Kolb, H. J., Borkhardt, A., and Schmetzer, H. (2008). Improved effector function of leukemia-specific T-lymphocyte clones trained with AML-derived dendritic cells. *Cancer Genomics Proteomics* **5**(5), 275-86.
- Seliger, B., Marincola, F. M., Ferrone, S., and Abken, H. (2008). The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med* **14**(12), 550-9.
- Sharpe, A. H. (2009). Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* **229**(1), 5-11.
- Shaw, S. K., and Brenner, M. B. (1995). The beta 7 integrins in mucosal homing and retention. *Semin Immunol* **7**(5), 335-42.
- Sheridan, B. S., and Lefrancois, L. (2011). Regional and mucosal memory T cells. *Nat Immunol* **12**(6), 485-91.
- Shipkova, M., and Wieland, E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta* **413**(17-18), 1338-49.
- Sille, F. C., Visser, A., and Boes, M. (2005). T cell priming by tissue-derived dendritic cells: new insights from recent murine studies. *Cell Immunol* **237**(2), 77-85.
- Smits, E. L., Berneman, Z. N., and Van Tendeloo, V. F. (2009). Immunotherapy of acute myeloid leukemia: current approaches. *Oncologist* **14**(3), 240-52.
- Soiffer, R. J. (2008). Donor lymphocyte infusions for acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **21**(3), 455-66.
- Spranger, S., Jeremias, I., Wilde, S., Leisegang, M., Starck, L., Mosetter, B., Uckert, W., Heemskerk, M. H., Schendel, D. J., and Frankenberger, B. (2012). TCR-transgenic lymphocytes specific for HMMR/Rhamm limit tumor outgrowth in vivo. *Blood* **119**(15), 3440-9.
- Staib, P. (2009). Akute myeloische Leukämie. 6 ed. In "Innere Medizin" (M. Böhm, M. Hallek, and W. Schmieg, Eds.), pp. 509-514. Elsevier Urban&Fischer, München.
- Starska, K., Glowacka, E., Kulig, A., Lewy-Trenda, I., Brys, M., and Lewkowicz, P. (2011). The role of tumor cells in the modification of T lymphocytes activity - the expression of the early CD69(+), CD71(+) and the late CD25(+), CD26(+), HLA/DR(+) activation markers on T CD4(+) and CD8(+) cells in squamous cell laryngeal carcinoma. Part I. *Folia Histochem Cytobiol* **49**(4), 579-92.
- Stelljes, M., Beelen, D. W., Braess, J., Sauerland, M. C., Heinecke, A., Berning, B., Kolb, H. J., Holler, E., Schwerdtfeger, R., Arnold, R., Spiekermann, K., Muller-Tidow, C., Serve, H. L., Silling, G., Hiddemann, W., Berdel, W. E., Buchner, T., and Kienast, J. (2011). Allogeneic transplantation as postremission therapy for cytogenetically high risk acute myeloid leukemia: Landmark analysis from a single prospective multicenter trial. *Haematologica*.
- van Dijk, A. M., Kessler, F. L., Stadhouders-Keet, S. A., Verdonck, L. F., de Gast, G. C., and Otten, H. G. (1999). Selective depletion of major and minor histocompatibility antigen reactive T cells: towards prevention of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* **107**(1), 169-75.
- Vardiman, J. W., Harris, N. L., and Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**(7), 2292-302.
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., and Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**(5), 937-51.
- Vasu, S., and Blum, W. (2013). Emerging immunotherapies in older adults with acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* **20**(2), 107-14.
- Vermeulen, M., Le Pesteur, F., Gagnerault, M. C., Mary, J. Y., Sainteny, F., and Lepault, F. (1998). Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **92**(3), 894-900.

- Vogelsang, G. B., Lee, L., and Bensen-Kennedy, D. M. (2003). Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med* **54**, 29-52.
- Wang, C., Lin, G. H., McPherson, A. J., and Watts, T. H. (2009). Immune regulation by 4-1BB and 4-1BBL: complexities and challenges. *Immunol Rev* **229**(1), 192-215.
- Wang, S., and Chen, L. (2004). T lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. *Cell Mol Immunol* **1**(1), 37-42.
- Watchmaker, P. B., Urban, J. A., Berk, E., Nakamura, Y., Mailliard, R. B., Watkins, S. C., van Ham, S. M., and Kalinski, P. (2008). Memory CD8+ T cells protect dendritic cells from CTL killing. *J Immunol* **180**(6), 3857-65.
- Wehler, T. C., Nonn, M., Brandt, B., Britten, C. M., Grone, M., Todorova, M., Link, I., Khan, S. A., Meyer, R. G., Huber, C., Hartwig, U. F., and Herr, W. (2007). Targeting the activation-induced antigen CD137 can selectively deplete alloreactive T cells from antileukemic and antitumor donor T-cell lines. *Blood* **109**(1), 365-73.
- Weiden, P. L., Flournoy, N., Thomas, E. D., Prentice, R., Fefer, A., Buckner, C. D., and Storb, R. (1979). Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* **300**(19), 1068-73.
- Westers, T. M., Houtenbos, I., van de Loosdrecht, A. A., and Ossenkoppele, G. J. (2006). Principles of dendritic cell-based immunotherapy in myeloid leukemia. *Immunobiology* **211**(6-8), 663-76.
- Wetzler, M., Marcucci, G., and Bloomfield, C. D. (2012). Acute and Chronic Myeloid Leukemia. In "Harrison's Principles of Internal Medicine" (D. L. Longo, K. D. L., J. J. L., F. A. S., H. S. L., and L. J., Eds.), Vol. 1, pp. 905-914. 2 vols. McGraw-Hill Medical.
- Wherry, E. J., Teichgraber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., von Andrian, U. H., and Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* **4**(3), 225-34.
- Whitmire, J. K. (2011). Induction and function of virus-specific CD4+ T cell responses. *Virology* **411**(2), 216-28.
- Whitmire, J. K., Benning, N., Eam, B., and Whitton, J. L. (2008). Increasing the CD4+ T cell precursor frequency leads to competition for IFN-gamma thereby degrading memory cell quantity and quality. *J Immunol* **180**(10), 6777-85.
- Willemze, R., Suciu, S., Mandelli, F., de Witte, T., and Amador, S. (2004). Autologous versus allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* **83 Suppl 1**, S134.
- Woiciechowsky, A., Regn, S., Kolb, H. J., and Roskrow, M. (2001). Leukemic dendritic cells generated in the presence of FLT3 ligand have the capacity to stimulate an autologous leukemia-specific cytotoxic T cell response from patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* **15**(2), 246-55.

8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Valentin Vogt, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„EXPRESSION UND RELEVANZ VON BETA-INTEGRINEN, AKTIVIERUNGS- UND DIFFERENZIERUNGSANTIGENEN AUF T-ZELLEN VOR UND NACH STIMULATION MIT DENDRITISCHEN ZELLEN LEUKÄMISCHEN URSPRUNGS.“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Tübingen, den 02.07.2016

Ort, Datum

Unterschrift

9. Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen:

- 04/2013 *CD4+ and CD8+ T-cell reactions against leukemia-associated- or minor histocompatibility antigens in AML patients after allogeneic SCT* B. Steger, S. Milosevic, G. Doessinger, S. Reuther, A. Liepert, M. Zerwes, J. Schick, **V. Vogt**, F. Schuster, T. Kroell, D. Busch, A. Borkhardt, H.J. Kolb, J. Tischer, R. Buhmann, H. Schmetzer
Immunobiology. 2014 Apr;219(4):247-60.
- 05/2013 *Antileukemic T-cell responses can be predicted by the composition of specific regulatory T-cell subpopulations.* J. Schick, **V. Vogt**, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C. Köhne, H.J. Kolb, R. Buhmann, H. Schmetzer
Journal of Immunotherapy. 2013 May;36(4):223-37.
- 07/2014 *Profiles of activation-, differentiation markers and β -Integrines contribute to predict T cells' antileukemic responses after stimulation with Leukemia-derived Dendritic Cells.*
V. Vogt, J. Schick, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C. Köhne, R. Buhmann, H.J. Kolb, H. Schmetzer
Journal of Immunotherapy. 2014 Jul-Aug;37(6):331-47

Buchbeiträge:

- 2012 **The T-Cells' Role in Antileukemic Reactions- Perspectives for Future Therapies**, H. Schmetzer and C. Schmid
Taner Demirer, New advances in Stem Cell Transplantation, in Tech Part 1: 'Basic Aspects of Stem Cell Transplantation' Chapter 4, pg 59-82, 2012
3.2 T-cells addressing unknown leukemia-specific antigens
3.2.1 Establishment and maintenance of protective immunity by dendritic cells derived from leukemic blasts (Group leaders: Borkhardt, Buhmann, Schmetzer; Scientists: Fischbacher, Freudenreich, Grabrucker, Liepert, Merle, Reuther, Schick, Schuster, **Vogt**)
3.2.2 Antileukemic T-cell profiles to predict antileukemic reactions of DC/DC-leukemia-stimulated T-cells and prognosis of patients (Group leaders: Schmetzer, Scientists: Fischbacher, Freudenreich, Grabrucker, Liepert, Merle, Schick, **Vogt**)

Kongressbeiträge/ Zitierfähige Abstracts

- 04/2011 *Antileukemic T-cell responses after dendritic cell stimulation can be predicted by compositions of regulatory T-cell subpopulations, especially with respect to regulatory central memory and regulatory CD8 cells.* J. Schick, **V. Vogt**, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C. Köhne, H.J. Kolb, R. Buhmann, H. Schmetzer.
EBMT (2011) P143
Bone Marrow Transplantation 46, supp 1, abstr. 1048 (2011)

- 04/2011 *Antileukaemic T-cell responses after DC-stimulation can be predicted by composition of T-cell subpopulations especially with respect to naïve, central memory and non-naïve T-cells.* **V. Vogt**, J. Schick, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C. Koehne, R. Buhmann, H.J. Kolb, H. Schmetzer.
EBMT (2011) P142
Bone Marrow Transplantation 46, supp 1, abstr. 1047 (2011)
- 09/2011 *The T-cells' role in anti-leukemic reactions and perspectives for future therapies of acute myeloid leukemia (AML).* H. Schmetzer, B. Steger, D. Bund, A. Gallo, G. Doessinger, J. Schick, **V. Vogt**, C. Grabrucker, A. Liepert, M. Freudenreich, S. Milosevic, J. Tischer, S. Reuther, F. Schuster, D. Busch, J. Adamski, A. Borkhardt, H.J. Kolb, C. Schmid, R. Buhmann. 13. wissenschaftliches Symposium der Medizinischen Klinik III, Herrsching, p55: Vortrag (2011).
- 04/2012 *Antileukaemic T-cell responses after DC-stimulation can be predicted by composition of T-cell subpopulations Tcm and Teff as well by the expression of activation markers and β -Integrins on T-cells.* **V. Vogt**, J. Schick, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C. Koehne, R. Buhmann, H.J. Kolb, H. Schmetzer.
EBMT (2012) P147
Bone Marrow Transplantation 47, supp 1, abstr. 882 (2012)
- 04/2012 *Paramunity-inducing factors have the capacity to improve DC-maturity, proportions of DCleu and early T-cell proliferation, but impair ex-vivo antileukemic functionality and therefore require thorough analyses before application in man.* C. Ansprenger, J. Schick, **V. Vogt**, M. Zerwes, T. Kroell, H.J. Kolb, B. Mayr, A. Mayr, H. Schmetzer
EBMT (2012) P148
Bone Marrow Transplantation 47, supp 1, abstr. 883 (2012)
- 04/2012 *CD4+ and CD8+ T-cell reactions against leukemia-associated- or minor histocompatibility antigens in AML patients after allogeneic SCT* B. Steger, S. Milosevic, G. Doessinger, S. Reuther, A. Liepert, M. Zerwes, J. Schick, **V. Vogt**, F. Schuster, T. Kroell, D. Busch, A. Borkhardt, H.J. Kolb, J. Tischer, R. Buhmann, H. Schmetzer
EBMT (2012) P149
Bone Marrow Transplantation 47, supp 1, abstr. 884 (2012)
- 04/2012 *Antileukaemic T-cell responses after dendritic cell stimulation can be predicted by compositions of regulatory T-cell subpopulations, especially with respect to regulatory effector/effector memory and regulatory CD8 cells.* J. Schick, **V. Vogt**, M. Zerwes, T. Kroell, C. Schweiger, C. Köhne, H.J. Kolb, R. Buhmann, H. Schmetzer.
EBMT (2012) P151
Bone Marrow Transplantation 47, supp 1, abstr. 898 (2012)

10. Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Helga Schmetzer, für die Überlassung des Promotionsthemas und die unermüdliche Unterstützung während meiner Promotion. Stets war Sie Fragen jeglicher Art zugänglich und wusste mich mit guten Anregungen in die richtigen Bahnen zu lenken. Ganz besonders möchte ich Frau Prof Schmetzer jedoch für ihre herzliche und verständnisvolle Art danken, mit der Sie mich in nicht immer einfachen Zeiten unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. med. Hiddemann danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Labor und für die Vertretung der Arbeit im Fachbereich Medizin.

Sehr bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr.med. Julia Schick und Herrn Christian Ansprenger für die gute Zusammenarbeit und den regen Gedankenaustausch, während der gesamten Zeit als Doktoranden.

Bei allen anderen Mitarbeitern des Labors möchte ich mich für die fachkundige Unterstützung bedanken. Insbesondere Frau Tanja Kroell für die Einarbeitung in die Labortätigkeiten und die experimentelle Unterstützung, als auch für ihr stets offenes Ohr für jegliche Fragen und Probleme bei der Datenauswertung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, Mama, Papa und Tilman sowie Gianna und den Freunden für viele schöne Stunden abseits des Labors und der Dissertation.

